

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 9 月 26 日 (26.09.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/074937 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 5/02, C12Q 1/02, A61K 38/17, 45/00, A61L 27/00, A61P 1/16, 35/00, G01N 33/15, 33/50

野町31-33 Tokyo (JP). 紙谷聡英 (KAMIYA, Akihide) [JP/JP]; 〒213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号 財団法人 神奈川科学技術アカデミー内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/10236

(22) 国際出願日: 2001 年 11 月 22 日 (22.11.2001)

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): CA, JP, US.

(30) 優先権データ:
特願2001-73590 2001 年 3 月 15 日 (15.03.2001) JP

規則4.17に規定する申立て:

— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人 神奈川科学技術アカデミー (KANAGAWA ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号 Kanagawa (JP). 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター (CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸ノ内ビルディング6階 Tokyo (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮島 篤 (MIYAJIMA, Atsushi) [JP/JP]; 〒177-0054 東京都練馬区立

(54) Title: METHOD OF DIFFERENTIATING IMMATURE LIVER CELLS BY USING EXTRACELLULAR MATRIX

(54) 発明の名称: 細胞外マトリクスを用いて未成熟肝細胞を分化させる方法

(57) Abstract: By culturing immature liver cells in a differentiation-inducing system containing glucocorticoid, oncostatin M and an extracellular matrix, completely mature liver cells can be successfully formed. In the liver cells thus formed, marker genes such as tryptophan oxygenase (TO) observed exclusively in mature liver cells are expressed. Thus, a method of differentiating immature liver cells into mature liver cells is provided. Also, a method of screening a compound controlling the differentiation of immature liver cells into mature liver cells by using the above method is provided. The finally differentiated liver cells thus provided are usable as a material of artificial liver. By using the liver cell differentiation culture system, a drug controlling liver differentiation can be screened and toxicity of drugs, etc. can be examined by using the mature liver cells.

[続葉有]

WO 02/074937 A1

BEST AVAILABLE COPY



(57) 要約:

グルココルチコイド、オンコスタチンM、および細胞外マトリクスを含む分化誘導系で未成熟肝細胞を培養することにより、完全に成熟した肝細胞を形成させることに成功した。形成された肝細胞では、成熟した肝細胞でのみ発現が見られるトリプトファンオキシゲナーゼ (T0) などのマーカー遺伝子が発現していた。本発明は未成熟肝細胞を成熟肝細胞へ分化させる方法を提供する。また、該方法を利用した未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化を調節する化合物のスクリーニング方法を提供する。本発明により提供される最終分化した肝細胞は、人工肝臓の材料として利用することができる。また、本発明の肝細胞分化培養系を用いれば、肝分化を制御する薬剤をスクリーニングしたり、成熟肝細胞を用いて薬剤の毒性等の検査を行うことが可能になる。

明細書

細胞外マトリクスを用いて未成熟肝細胞を分化させる方法

技術分野

本発明は、細胞外マトリクスを利用して未成熟肝細胞を分化させる方法、および該方法を利用した未成熟肝細胞の分化を調節する化合物の試験方法およびスクリーニング方法に関する。本発明により分化させた肝細胞は、再生医療や人工肝臓へ利用され得る。また薬代謝のアッセイ系およびスクリーニング系に利用され得る。

背景技術

肝臓は非常に再生力に富む臓器であり、理論的には2/3の細胞を失っても再生できることが知られている。しかし、慢性肝炎やアルコールの過剰摂取などによって肝細胞（肝実質細胞；肝機能を司る細胞）の炎症と再生を繰り返すうちに、破壊された肝細胞の再生が不可能になり、肝細胞の間に存在する結合組織の量が増大し肝硬変の発症につながっていく。その結果、肝機能の低下が生じ、凝固因子などの血清蛋白質合成能の低下による出血やビリルビンの蓄積による黄だん、アンモニアの蓄積による意識障害などの症状を引き起こす。さらに、繊維化し構造的に変質した肝臓は、再び機能を回復することができない。このような末期肝硬変に対する根本的な治療として考えられるのは肝臓移植であるが、国内においてはドナーの不足等の問題点が多い。そこで、他から供された、また自分自身の少数の幹細胞を増殖、分化させることで、人為的に組織、器官を再構成する再生医学的手法が次世代の治療法として期待されている。肝細胞の体外での増殖および分化が可能になれば、人工肝臓や細胞移植などの医学的な応用に

極めて有用であることに加え、肝機能の特徴および作用機構の解析や薬代謝のモデル系としても利用することができる。

肝細胞の体外での培養系の構築のため、これまで成体肝細胞を用いた継代培養には多くの検討が加えられている。特に、成体内に存在する小型の肝細胞の継代培養を可能とするために、様々な添加物の関与が調べられている (Tateno, C. and Yoshizato, K., *Am. J. Pathol.* 149(5):1593-1605, 1996; Mitaka, T. et al., *Hepatology* 16(2):440-447, 1992)。しかし成体肝細胞を用いた継代培養系では、高い肝機能を保持しているものの、細胞の増殖性が低く、医学的応用等に多数の細胞を必要とすること、また培養中に肝機能を失っていくために、長期間の培養が難しいという問題がある。また、成体内の小型肝細胞は、増殖性が高く長期間の増殖は可能ではあるが、成体の肝臓内にごく一部しか存在せず、多数の細胞を回収することが困難であること、また一部の肝機能を再構成できないという問題が存在する。

一方、胎生肝細胞は増殖性に富み、また回収の容易であるなどの利点を有している。しかしながら、成体の肝臓が代謝、血漿蛋白質の合成、解毒作用などを通じて生体のホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしている (Oliver, I. T. et al. (1983) *Differentiation* 24, 234-238; Perry, S. T. et al. (1983) *J. Cell Biochem.* 21, 47-61; Shelly, L. L. et al. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 3403-3410) のに対し、胎生期の肝臓は、AGM領域より移動してきた血液細胞の増殖の場として働いており、成熟肝細胞の機能はほとんど保持していない (Orkin, S. H. (1996) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 597-602)。発生段階において、血液細胞が骨髓、脾臓へと移行していくに従い、未成熟な肝臓は本来の機能を果たすために様々な成熟肝細胞特異的遺伝子の発現を始める。例えば、グルコース-6-ホスファターゼ (glucose-6-phosphatase; G6Pase) やチロシンアミノトランスフェ

ラーゼ (tyrosine amino transferase; TAT) といった代謝系酵素の発現が、胎生後期から新生児期にかけて開始される (Greengard, O, "The developmental formation of enzymes in rat liver" (ラット肝臓における酵素の発生形成), *In* Litwack G, eds., "Biochemical Actions of Hormones" (ホルモンの生化学的作用), New York: Academic Press Inc., 1970; 53-87; Haber, B.A. et al. (1995) *J. Clin. Invest.* 95: 832-841)。分化の最終段階は生後に進行し完全に成熟した肝臓はトリプトファンオキシゲナーゼ (tryptophan oxygenase; T0) のような成体肝特異的酵素を発現する (Nagao, M. et al. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 867: 179-186)。また周産期にかけて、肝細胞は薬剤の解毒に鍵となる役割を果たす様々なタイプのチトクロームP450 (cytochrome P450s; CYPs) の発現を始める。

本発明者らはこの胎生中期から新生児期における肝細胞の造血器官から代謝器官への変化の過程に、インターロイキン (interleukin; IL)-6サイトカインファミリーに属するオンコスタチンM (oncostatin M; OSM) が重要な役割を持つことを既に見出している (Kamiya, A. et al. (1999) *EMBO J.* 18,2127-2136)。OSMによる肝機能の誘導は、gp130受容体-STAT3転写因子を介して作用する。マウス胎生14日由来の肝細胞にOSMを添加することで G6Pase、TATの発現を誘導し、またグリコーゲンの蓄積、アンモニア分解といった肝機能も誘導することができる。また、肝臓内でのOSMおよびその受容体の発現を解析したところ、OSMは血液細胞に発現し、受容体は接着系細胞に見られた。しかし、このシグナルの活性化のみでは、最終分化した肝細胞に特有のT0や解毒作用に重要な役割を果たしているCYPファミリーの遺伝子発現は誘導されず、完全な肝機能を試験管内で再構成できなかった。

このように、体外において未成熟肝細胞を最終分化させる方法は未だ知

られていない。未成熟肝細胞から成熟肝細胞への分化を誘導する系が確立されれば、機能的肝細胞を多量に生産することが可能となり、人工肝臓の開発への道が開かれる。人工肝臓は、肝不全、肝臓癌、肝硬変等肝機能の低下を伴う患者の治療にとって重要であり、殊に、生体肝細胞を用いた正常肝細胞（癌細胞ではない）からなる人工肝臓を作製することが可能となれば、その恩恵を受ける患者は多く、社会的にも産業的にもきわめて価値の高いものとなる。また、正常肝細胞からなる培養系、また人工肝臓は、肝炎ウイルスなどの感染モデル系としても使用可能であり、ウイルスの治療薬のスクリーニング系などへの応用が可能である。このように、肝臓の発生のメカニズムの解明という研究上の目的のみならず、肝関連疾患の治療など産業上の目的を達成するためにも、肝機能を最終的に保持する肝細胞を多量に生産する系の確立が望まれている。

発明の開示

本発明は、未成熟肝細胞から成熟肝細胞への最終分化を誘導する方法を提供する。より詳しくは、細胞外マトリクス存在下で未成熟肝細胞の分化を誘導することにより、該細胞を成熟肝細胞へ分化させる方法を提供する。また、本発明は、該方法を利用した未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化を調節する化合物の試験方法およびスクリーニング方法を提供する。

胎生中期由来の肝細胞は様々なサイトカインやケモカインを発現し、造血支持能を持っているが、この活性はOSMによって誘導される肝成熟に従い失われる (Kinoshita, T. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 7265-7270)。つまりOSMは、血液細胞によって供給され、肝細胞等の接着細胞に作用するバラクラインファクターであると考えられ、造血器官から代謝器官へと変化する肝分化の過程における重要な液性因子であること

が示唆される。OSMは胎生中期から新生児期の肝臓で発現しているが、その後成熟に従って肝臓内の発現量は減少していく。本発明者らは、この時期以降の肝臓に発現しているサイトカインを解析し、肝再生に関与する因子として知られる肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) が、出生期から数日をピークとして発現していることを見出した。HGFを培養系に添加すると、OSMと同様に肝細胞の分化を誘導することから、HGFが胎生後期から出生後の肝成熟を司る因子である可能性が考えられた。しかし、OSMおよびHGFでは、誘導されるTATの発現は成体肝におけるよりも低く、また出生後数日を経て完全に成熟した肝細胞でのみ発現が見られるトリプトファンオキシゲナーゼ (TO) などについては、その発現を誘導できず、完全な成熟肝細胞の機能を再現することは成功しなかった。

本発明者らは、OSMやHGFだけで未成熟肝細胞の最終分化を誘導できないのは、これらの因子は胎生中期の肝細胞に作用し、出生期前後の形質を誘導する肝細胞成熟促進因子であるが、肝細胞の最終分化過程には全く別の因子が作用しているからだと考えた。

ところで成熟肝細胞の遺伝子発現や肝機能の制御に関しては、液性因子以外にも細胞間接着や細胞外マトリクス等が関与していることが知られている。例えば胎生肝細胞は高密度培養により外来の増殖因子を加えなくても新生仔期の段階にまで分化することができる (Kojima, N. et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277,152-158)。高細胞密度によるシグナル伝達の誘導には細胞間の接触が関与すると予想されるが、OSMにより誘導される分化に重要なSTAT3は密度による分化誘導には必要とされない (Kojima, N. et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277,152-158; Ito, Y. et al. (2000) Hepatology 32: 1370-1376) ことから、肝発生には複数のシグナル経路が存在することが示唆される。また、細胞外マトリクスは、成熟肝細胞の機能維持に重要な役割を果たしている (Costa,

R.H. et al. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9: 1415-1425; Ip, Y.T. et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 3770-3781)。成熟肝細胞は、通常の培養条件下での一層培養では脱分化した表現型を示すようになり、形態が平坦になる他、アルブミン、ホスホエノールピルビン酸キナーゼ、TAT、T0、および肝で発現が高い幾つかの転写因子などの遺伝子発現は減少し、急速に肝機能を失っていく (Schuetz, E.G. et al. (1988) *J. Cell Physiol.* 134: 309-323; Caron, J.M. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 1239-1243; Matsushita, N. et al. (1994) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 1514-1516)。しかし、ラミニン、Type IV コラーゲン等の混合物であるEHSゲル (Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma tumor 由来の細胞外マトリクス) 上で単層培養する、もしくはEHSゲルを細胞上に添加することで、失った遺伝子発現が回復することが報告されている (Block, G. D. et al. (1996) *J. Cell Biol.* 132, 1133-1149; Oda, H. et al. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 800-805)。また、肝細胞等の上皮系細胞は極性を持ち、apical側とbasal側の細胞膜でそれぞれ別々の蛋白質が発現しているが、成熟肝細胞を試験管内で培養すると、その極性は失われる。この極性も、EHSなどの細胞外マトリクスの添加によって回復することが明らかとなっている (Talamini, M. A. et al. (1997) *Hepatology* 25, 167-172; Musat, A. I. et al. (1993) *Hepatology* 18, 198-205)。本発明者らは、成熟肝細胞の機能の維持に關与する細胞外マトリクスが、胎生肝細胞の最終分化過程においても重要な役割を果たしている可能性があると考えた。

そこで本発明者らは、胎生肝細胞の初代培養系を用いて肝細胞の最終分化を誘導する因子の探索を行った。細胞外マトリクスとして、ラミニンおよびコラーゲンを含むEHSゲルを用い、これを胎生肝細胞の初代培養系に重層し、細胞の形態、遺伝子発現、肝機能等への変化を解析した。その結果、未成熟胎児肝細胞へのEHSゲル添加によって、細胞の形態変化やチロシン

アミノトランスフェラーゼ (TAT) およびCYP2B10といった成熟肝機能に関わる遺伝子群の発現が誘導されることが判明した。特に、最終分化に至った肝細胞でのみ発現しているトリプトファンオキシゲナーゼ (TO)が、OSMとEHSゲルの両方を添加したときにのみ、強く誘導されることが判明した。この結果から、細胞外マトリクスが肝機能を促進すること、特にOSMとの協調作用によって、胎生肝細胞の最終分化を誘導できることが明らかとなった。

OSMの非存在下でEHSで刺激することによっても胎生肝細胞のTATの発現を誘導できることから、EHSはそれ自体のみで肝細胞の分化を促進する活性を示すことが示された。また、細胞外マトリクスによって最終分化を誘導するためには、一定時間のOSM刺激の処理が重要であった (図 2 C)。つまり、胎生中期の幼弱肝細胞が成体の機能を獲得するためには、まずOSMによって引き起こされる成熟過程の変化が、最終的なEHSによる分化誘導に影響を与えていると考えられる。TATの発現はOSMによる前処理が比較的短い段階でも、EHSによって誘導されることから、EHSによる最終分化誘導に特異的に必要とされる細胞の変化がOSMによって前もって制御されている可能性がある。また、高密度培養により胎生肝細胞の分化はさらに増強されることが判明した。

また本発明者らは、この最終分化を引き起こす分子メカニズムについて解析を行った。コラーゲン、ラミニンのレセプターであるインテグリン $\beta 1$ の中和抗体を培養系に添加したところ、OSM非存在下でEHSゲルにより誘導される TAT の発現が有意に阻害されたことから、肝細胞の最終分化は、インテグリンと細胞外マトリクスとの相互作用により促進され得ることが示された。しかしこの抗体によってもOSMとEHSで誘導されるTOの発現は抑制されなかったことから、胎生肝細胞の最終分化は主にインテグリン $\beta 1$ 非依存的なシグナル経路により調節されていることが示唆された。

このように本発明者らは、細胞外マトリクスと共に未成熟肝細胞を培養することで、最終分化した肝細胞を試験管内で再構成することに成功した。本発明によって、増殖性に富む胎生肝細胞を体外で成熟させ、成熟肝細胞とほぼ同等な肝機能を再構成することが初めて可能となった。

本発明の方法およびこれにより調製される成熟肝細胞は所望の目的のために使用され得る。例えば、本発明により提供される成熟肝細胞の分化誘導系は、肝細胞の発生にかかわる因子の解明や、肝細胞の成熟を調節する化合物のアッセイやスクリーニングに利用することが可能である。肝細胞の成熟を調節する化合物は、肝関連疾患の治療薬や予防薬への応用が期待される。あるいは、調製された肝細胞は、ある化合物が該肝細胞により解毒されるか否かなどを調べることにより、人体に毒性を有するか否かの検定に用いることも考えられる。さらに、肝炎ウイルスの増幅・感染系として使用することで、抗ウイルス薬のスクリーニング系などとしても応用可能である。本発明の未成熟肝細胞を分化させる方法は、成熟肝細胞の製造方法として有用である。また本発明は、本発明の未成熟肝細胞を分化させる方法により製造された成熟肝細胞を提供する。

また、本発明により提供される分化誘導系は人工肝臓の作製のために重要である。難治肝疾患に対する治療として期待されている人工肝臓は、成体肝細胞を用いる場合、増殖性が低く長期間の培養では肝機能を失いやすいという欠点がある。本発明において胎生肝細胞を用いれば、増殖性が高く回収も容易である。胎生肝細胞を増殖させ必要な数量を確保した後に、本発明の方法に従い、OSMおよび細胞外マトリクスの添加によって肝分化を誘導することが可能である。本発明により提供される分化誘導系は、肝細胞を体内に移植する再生医療への応用も考えられる。構築された成熟肝細胞は、生体への移植、あるいは人工肝臓として利用されたり、また肝移植や肝再生までの延命治療に用いられることを通じて、効果的な治療法の少

ない肝硬変や進行肝がんなどの難治疾患の病態改善が可能になると考えられる。

すなわち本発明は、細胞外マトリクスを利用した未成熟肝細胞を分化させる方法、および該方法を利用した未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化を調節する化合物の試験方法およびスクリーニング方法等に関し、より具体的には、

(1) 未成熟肝細胞を分化させる方法であって、(a) グルココルチコイドの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、(b) オンコスタチンMの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、および(c) 細胞外マトリクスの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、を含む方法、

(2) (1) に記載の方法であって、(a) グルココルチコイドの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、(b) オンコスタチンMの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、および(c) 細胞外マトリクスの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、を含む方法、

(3) 工程(c) が、細胞外マトリクスを含むゲルを未成熟肝細胞に重層して培養する工程である、(3) に記載の方法、

(4) 未成熟肝細胞が哺乳動物の胎生肝細胞である、(1) から(3) のいずれかに記載の方法、

(5) 細胞外マトリクスがラミニンおよび/またはコラーゲンを含む、(1) から(3) のいずれかに記載の方法、

(6) (1) から(3) のいずれかに記載の方法により調製された成熟肝細胞、

(7) 細胞外マトリクスを有効成分とする、未成熟肝細胞の分化促進剤、

(8) 細胞外マトリクスがラミニンおよび/またはコラーゲンを含む、(7)

)に記載の未成熟肝細胞の分化促進剤、

(9) 未成熟肝細胞が哺乳動物の胎生肝細胞である、(7)または(8)に記載の分化促進剤、

(10) 未成熟肝細胞の分化に及ぼす化合物の効果を試験する方法であって、

(a) (i) グルココルチコイドの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、(ii) オンコスタチンMの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、および(iii) 細胞外マトリクスの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、を含む方法により未成熟肝細胞を分化させる過程のいずれかにおいて被検試料を該細胞に接触させる工程、および

(b) 該未成熟肝細胞の分化を検出する工程、を含む方法、

(11) 未成熟肝細胞の分化を抑制または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (i) グルココルチコイドの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、(ii) オンコスタチンMの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、および(iii) 細胞外マトリクスの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、を含む方法により未成熟肝細胞を分化させる過程のいずれかにおいて被検試料を該細胞に接触させる工程、

(b) 該未成熟肝細胞の分化を検出する工程、および

(c) 被検試料非存在下で該分化を検出した場合(対照)と比較して、該分化を抑制または促進する化合物を選択する工程を含む方法、

(12) 工程(a)が、(i) グルココルチコイドの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、(ii) オンコスタチンMの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、および(iii) 細胞外マトリクスの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、を含む方法、

る工程、を含む方法により未成熟肝細胞を分化させる過程のいずれかにおいて被検試料を該細胞に接触させる工程である、(10)または(11)に記載の方法、

(13)工程(a)の(iii)が、細胞外マトリクスを含むゲルを未成熟肝細胞に重層して培養する工程である、(12)に記載の方法、

(14)細胞外マトリクスがラミニンおよび/またはコラーゲンを含む、(10)または(11)に記載の方法、

(15)未成熟肝細胞が哺乳動物の胎生肝細胞である、(10)または(11)に記載の方法、

(16)(10)または(11)に記載の方法により同定または単離しうる化合物を含む、未成熟肝細胞の分化調節剤、に関する。

本発明において「細胞外マトリクス」(extracellular matrix; ECM)とは、細胞を取り巻く構造体およびその同等物を指し、一般に細胞外に分泌され蓄積される生体高分子の会合体からなる。天然のECMは、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどを含む、細胞外に分泌され蓄積された生体高分子が複雑な会合体を形成している。生体においてECMは、組織の構造構築の他、細胞接着を通じた細胞骨格の配向、細胞増殖、分化等の制御を行っている。ECMは組織に由来するものであってもよく、また培養細胞等により生産されたものであってもよい。また、天然のECMと同等の肝細胞分化促進活性を有する限り、天然のECMの精製物、誘導体、修飾物、または人工的に合成されたものであってもよい。例えば、コラーゲンまたはラミニンなどのECM分子を含む合成マトリクスなどはECMに含まれる。

ECMの細胞への接着により特異的な細胞内シグナル伝達が活性化する。ECMが誘導するシグナル伝達としては、インテグリンファミリー(Integrin α ファミリーおよび β ファミリー等)を介したシグナル伝達、ジスコイジ

ンドメイン受容体 (discoidin domain receptor; DDR) ファミリー (DDR1 およびDDR2等) を介したシグナル伝達等が知られている (Shrivastava, A. et al. (1997) Mol. Cell 1: 25-34; Vogel, W. et al. (1997) Mol. Cell 1: 13-23)。それぞれのシグナルは、ECM中に含まれる成分がリガンドとして細胞表面の受容体に作用することにより、受容体が活性化されシグナルが下流に伝達される。例えば、インテグリンは α 鎖 β 鎖のヘテロダイマーで、コラーゲンやラミニン、フィブロネクチンと言ったECM分子をリガンドとして結合し、シグナルを細胞内に伝達する作用を持っている。インテグリンの下流のシグナルとしては、FAKなどのキナーゼを活性化するほか、アクチンなどの細胞内骨格の制御やイノシトールリン酸系の関与が知られている (Calderwood, D. A. et al., J. Biol. Chem. 275(30):22607-22610, 2000)。また、DDRファミリーは、膜貫通型のチロシンキナーゼで、コラーゲンやラミニンの結合によってキナーゼ部位が活性化され、MAPK等にシグナルを伝達する (Vogel, W. et al., Mol. Cell 1(1):13-23, 1997; Vogel, W. et al., J. Biol. Chem. 275(8):5779-5784, 2000)。例えばECM受容体やシグナル伝達分子のリガンドまたはアゴニストを用いてこれらのシグナル伝達を活性化させることにより、ECMの細胞への接触と同等の効果を得ることもできる。

本発明において「グルココルチコイド」(Glucocorticoids, 「糖質コルチコイド」とも言う) とは、哺乳動物の副腎皮質から分泌されるステロイドホルモンおよびそれと同等の作用を有する化合物を言う。グルココルチコイドは天然化合物または合成化合物であってよい。グルココルチコイドには、コルチゾール (Cortisol)、コルチゾン (Cortisone)、コルチコステロン (Corticosterone) などが含まれる。合成グルココルチコイドには、デキサメタゾン (dexamethasone; Dex) およびプレドニソロン (predonisolone) などが含まれる。

グルココルチコイドによるシグナル伝達はグルココルチコイドレセプター (GR) により伝達される。すなわち、GRにグルココルチコイドが結合すると、GRは核内へと移行してGR結合部位を持つ遺伝子の発現を活性化する (Miner, J. N. and Yamamoto, K. R., Trends Biochem. Sci. 16(11):423-426, 1991)。

本発明において「オンコスタチンM」とは、ヒトおよびマウスを含む哺乳動物由来のオンコスタチンM (Malik, N. et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 2847-2853; Yoshimura, A. et al. (1996) EMBO J. 15, 1055-1063) およびそれらと同等の作用を有する化合物を言う。

オンコスタチンM (OSM) は、IL-6、IL-11、白血病抑制因子 (LIF)、毛様体神経栄養因子、およびカルジオトロフィン-1を含むIL-6関連サイトカインファミリーに属する一員である (Bazan, J. F. (1991) Neuron 7, 197-208; Rose, T. M. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88, 8641-8645; Pennica, D. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 10915-10922)。これらのサイトカインは、その受容体がいずれもgp130をシグナルトランスデューサーとしているため、類似の機能を示すことが多い (Taga, T. et al. (1997) Annu. Rev. Immunol. 15, 797-819)。特に、ヒトOSM (hOSM) (Malik, N. et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 2847-2853) は、M1単球の分化誘導作用 (Rose, T. M. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88, 8641-8645; Bruce, A. G. et al. (1992) J. Immunol. 149, 1271-1275) や、肝細胞の急性期蛋白質誘導作用 (Richards, C. D. et al. (1992) J. Immunol. 148, 1731-1736; Baumann, H. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 8414-8417) などのように、LIFと共通の生物学的機能を数多くもっている。また、ヒトOSMは、内皮細胞の増殖促進作用 (Wijelath, E. S. et al. (1997) J. Cell Sci. 110, 871-879) や平滑筋の増殖促進作用 (Grove, R. I. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A

90, 823-827) などのように、特有の機能ももっている。本発明において OSM は、ヒトを含む哺乳動物由来の OSM およびそれらと同等の活性を有する誘導体が含まれる。

現在までに、2 種類のヒト OSM 受容体が同定されている。I 型 OSM 受容体は LIF 受容体と同一で、gp130 と LIF 結合サブユニットから構成され (Gearing, D. P. et al. (1991) EMBO J. 10, 2839-2848; Gearing, D. P. et al. (1992) Science 255, 1434-1437; Liu, J. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 16763-16766)、II 型受容体は gp130 と OSM 特異的サブユニットから構成される (Mosley, B. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 32635-32643)。つまり、LIF と OSM との共通の機能は I 型受容体を介するものであり、OSM 特有の活性は II 型受容体によって伝達されている (Thoma, B. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 6215-6222; Mosley, B. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 32635-32643)。本発明において OSM は、OSM 受容体のリガンドとして作用する化合物が含まれる。

マウスの OSM は特有の受容体 (II 型受容体) しか使用せず、LIF 受容体とは反応しない (Ichihara, M. et al. (1997) Blood 90, 165-173; Lindberg, R. A. et al. (1998) Mol. Cell. Biol. 18, 3357-3367)。マウスの OSM は、造血細胞中で IL-3 により誘導される遺伝子としてクローニングされ (Yoshimura, A. et al. (1996) EMBO J. 15, 1055-1063)、骨髓やさまざまな種類の造血細胞で発現していることが示されている (Ichihara, M. et al. (1997) Blood 90, 165-173)。哺乳動物の OSM II 型受容体に結合し、該受容体からのシグナル伝達を活性化させる化合物は、本発明において OSM に含まれる。

本発明は、未成熟肝細胞の分化を促進する方法に関する。本発明の方法は、好ましくは未成熟肝細胞に細胞外マトリクスを接触させることにより行う。本発明により細胞外マトリクスが未成熟肝細胞から成熟肝細胞への

分化を促進する効果を有することが実証された。これまで、未成熟肝細胞は、OSMおよびデキサメタゾンの存在下でG6PaseやTATの発現が誘導され、グリコーゲンの蓄積やアンモニア分解などの肝細胞機能を発現させることはできるが、最終分化した成熟した肝細胞で発現するT0等の遺伝子の発現は誘導することができず、完全に成熟した肝細胞にまで分化させることはできなかった。本発明において、細胞外マトリクスを用いて未成熟肝細胞の分化を誘導することによって、完全に成熟した肝細胞にまで分化させることに初めて成功した。このことは、細胞外マトリクスが、未成熟肝細胞における重要な分化促進因子であることを示している。未成熟肝細胞に細胞外マトリクスを接触させることにより、肝細胞への分化を促進することができる。

また本発明者らは、細胞外マトリクスによる肝細胞の分化には、インテグリン β 1依存のおよび非依存的なシグナル伝達の双方が関与することを見出した。例えば、インテグリン β 1に対する中和抗体によりインテグリン β 1を介したシグナルを特異的に遮断すると、OSMの非存在下でECMにより誘導されるTATの発現が強く阻害された。このことは、インテグリン依存的なシグナル経路の活性化が、肝細胞の分化の促進に寄与し得ることを示している。従って、本発明において用いられる細胞外マトリクスとしては、インテグリンのリガンドを含むものが好ましい。インテグリンのリガンドとは、インテグリンファミリーに属する蛋白質に結合し、該蛋白質を介したシグナル伝達を活性化する化合物を指す。天然の細胞外マトリクスには、コラーゲンやラミニンなどのインテグリンのリガンドとして機能する蛋白質が含まれており、これによりインテグリンを介したシグナルを活性化させることができる。一方、OSMおよびECMで刺激した肝細胞は、インテグリン β 1に対する中和抗体の存在下でもTATおよびT0の発現が誘導され、さらにインテグリン β 1に対する中和抗体およびインテグリンファミリーの阻

害剤であるRGDペプチドの添加によってもT0の発現誘導は残存したことから、インテグリン $\beta 1$ を介したシグナル伝達の活性化は、ECMによる肝細胞の分化に必須ではなく、細胞外マトリクスによるインテグリン非依存的な経路の活性化が、肝細胞の分化を十分に促進することが示された。従って、例えばインテグリン $\beta 1$ を介したシグナル伝達を活性化しないECMを用いることによっても、未成熟肝細胞の分化を有効に誘導することができる。最近、インテグリン以外の細胞外マトリクスの受容体として、DDRファミリー（DDR1、DDR2）が同定されている。DDRはチロシンキナーゼ受容体であり、コラーゲン、ラミニン等の結合により、インテグリン非依存的に活性化する（Vogel, W. et al. (2000) J. Biol. Chem. 275: 5779-5784）。また、DDR1が筋芽細胞株の筋繊維への分化に重要であることが示されている。胎生肝細胞でも、DDRと細胞外マトリクスとの相互作用が肝の最終分化誘導に参与している可能性は高い。本発明において用いられる細胞外マトリクスとしては、DDRのリガンド（すなわち、DDRファミリーに属する蛋白質に結合し、該蛋白質を介したシグナル伝達を活性化する化合物）が含まれていてよい。細胞外マトリクスにより活性化されるこれらのシグナルのいずれか、好ましくはインテグリン非依存的なシグナル経路、より好ましくはインテグリン依存的および非依存的なシグナル経路の両方を活性化することにより、未成熟肝細胞からの成熟肝細胞への分化を効果的に促進することができる。

細胞外マトリクスは所望の方法により調製することができる。例えば適当な培養細胞を培養し、分泌される細胞外マトリクスを回収することにより調製することができる。また、組織から抽出することもできる。あるいは、市販の細胞外マトリクスを用いることができる。細胞外マトリクスは、不溶性の架橋分子を含む半固体（ゲル状）または固体であってよい。

生体内で細胞外マトリクスを分泌している細胞として、肝臓内では非実

質細胞の1つである星細胞が知られている。そこで、星細胞と胎生肝細胞の混合培養系を構築することで、胎生肝細胞の最終分化を誘導することができる可能性が挙げられる。

肝細胞などの上皮系細胞は、basal側、apical側といった細胞の極性があることが知られており、それぞれの側の細胞膜で発現している膜蛋白質等は異なっている。本発明において細胞外マトリクスと共に未成熟肝細胞を培養して肝成熟を行うことにより、細胞外マトリクスと肝細胞の相互作用が、遺伝子発現の面だけでなく、細胞の極性の形成にも貢献し得る。細胞の極性はDPPIVやCx32等の局在の変化によって確認することができる。

細胞外マトリクスの存在下で未成熟肝細胞を培養することにより、細胞外マトリクスが細胞表面の受容体に作用しシグナル伝達が活性化される。インテグリンまたはDDRファミリー等の細胞外マトリクス受容体を活性化させるためには、これらの受容体のリガンドやアゴニストを用いることもできる。シグナル伝達を行う受容体に対するリガンド/アゴニストを細胞に接触させることにより、細胞外マトリクスを用いた場合と同等の効果を達成することができる。例えば人工的に形成したマトリクスにこれらのリガンド/アゴニストを添加または固定化したものを用いることもできる。本発明における細胞外マトリクスには、これらの合成マトリクスも含まれる。例えばインテグリン $\beta 1$ のリガンドとしては、ラミニンおよびコラーゲンが知られている。ラミニンおよび/またはコラーゲンを含むマトリクスは、本発明において好適に用いられる。

本発明の未成熟肝細胞を分化させる方法は、具体的には、(a) グルココルチコイドの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、(b) オンコスタチンMの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、および(c) 細胞外マトリクスの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工

程、を含む。これらの工程は同時またはオーバーラップしてよく、特に工程（a）および（b）を同時を行い、その後工程（c）を行うことが好ましい。また工程（c）においても工程（a）を行うことが好ましい。本発明はより具体的には、工程（a）はグルココルチコイドの存在下で未成熟肝細胞を培養することにより、工程（b）はオンコスタチンMの存在下で未成熟肝細胞を培養することにより、および工程（c）は、細胞外マトリクスの存在下で未成熟肝細胞を培養することにより実施することができる。すなわち本発明は、（a）グルココルチコイドの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、（b）オンコスタチンMの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、および（c）細胞外マトリクスの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、を含む未成熟肝細胞を分化させる方法を提供する。これらの工程は上記と同様にオーバーラップしてよく、例えばオンコスタチンMで刺激し、その後細胞外マトリクスで分化を誘導する期間グルココルチコイドを共存させることが好ましい。

未成熟肝細胞の分化をin vitro（生体外）で行わせる場合は、通常、約 $1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ から約 $6 \times 10^4/\text{cm}^2$ の未成熟肝細胞を播く。例えば培養ディッシュで未成熟肝細胞の分化を行う場合は、未成熟肝細胞を培養ディッシュ等に撒き、細胞外マトリクスの存在下で培養を行う時は上層に細胞外マトリクスを重層するのが好ましい。あるいは、細胞外マトリクスをコートした基材に未成熟肝細胞を付着させて培養することができる。また、細胞外マトリクスによるサンドイッチ培養も好適である。実施例に示すように、6 wellプレートの 1 well（有効培養面積 9.6cm^2 ）に 2×10^5 細胞の低密度培養に比べ、同 6×10^5 細胞の高密度培養における方が、肝細胞への高い分化効率を示した。従って、肝細胞の分化においては高密度培養を用いることが好ましい。高密度培養とは、約 $4 \times 10^4/\text{cm}^2$ 以上、好ましくは約 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 以上、より好ましくは約 $6 \times 10^4/\text{cm}^2$ 以上である。細胞は通常、約 5

$\times 10^5/\text{cm}^2$ 以下で培養される。

培地には、通常、約10%のウシ胎仔血清 (fetal calf serum; FCS) またはこれと同等の補剤を添加する。また、約1ng/mlから約1 μ g/ml、好ましくは約5ng/mlから約0.1 μ g/ml、例えば約10ng/mlのOSMを添加する。培養が長期間 (数日以上) に亘る場合には適宜培地交換を行う。培地には、OSMとともに、例えば約 5×10^{-8} から約 5×10^{-7} M、好ましくは約 1×10^{-7} Mのデキサメタゾン (Dex) またはこれと同等のグルココルチコイドを添加する。さらに、約 1~10 μ g/mlのインシュリンを添加することも好ましい。例えば、培地に Insulin-Transferrin-Selenium X (ITS) を添加することができる。培地にはビルビン酸やエタノールアミン等が含まれていてもよい。また、培養系には、他のサイトカイン類を添加してもよい。例えば、胎児肝細胞において出生期から数日をピークとして発現しているHGFが、肝細胞の分化誘導に重要な役割を果たしていることが示されている (Defrances, M. C. et al. (1992) Development 116: 387-395; Hu, Z. et al. (1993) Am. J. Pathol. 142: 1823-1830; Kagoshima, M. et al. (1992) Eur. J. Biochem. 210: 375-380)。これらのサイトカインを培養系に添加することもできる。また、初期の肝臓原器からさらに成熟が進んだ肝臓への分化には、FGF-1などが必要とされることが既にわかっている。これらのサイトカインを順次培養系に添加することができる。これにより、肝臓の発生過程を最初から最後まで試験管内で再現することも可能になると考えられる。現在、骨髄や成体の肝臓などから様々な肝幹細胞の候補が同定されている。これらの細胞を本発明の系に適用することで、試験管内で所望の増殖、分化を誘導することが可能となる。培養は、通常の組織培養条件、例えば、約5% CO₂、約20% O₂ 存在下、約37°Cで行うことができる。

上記の培養系に細胞外マトリクスを添加する。細胞外マトリクスは、例えば細胞に重層する。細胞外マトリクスの添加時期に特に制限はない。実

施例に示すように、細胞外マトリクスによる肝細胞成熟は、前もってOSMによる分化が誘導されているほど効率が高かった。従って、まずOSMおよびデキサメタゾンの存在下で未成熟肝細胞を培養し、その後ECM存在下でこの細胞を培養することか好ましい。例えばOSMおよびDexによる培養を数日間行ったら、細胞外マトリクスを添加することで効果的に肝細胞の成熟を誘導することができる。肝細胞の最終分化を効率的に誘導するためには、通常、事前に3日より多い期間（72時間より多い時間）、好ましくは4日以上、より好ましくは5日以上OSM刺激が必要とされる。その後、細胞外マトリクスを重層することで、強く最終分化が誘導される。EHSは、約0.2mg/ml～約0.5mg/ml、例えば約0.36mg/mlの濃度で添加することが好ましい。

本発明の未成熟肝細胞の分化方法において、グルココルチコイドおよびオンコスタチンMの刺激後に細胞外マトリクスを添加するような態様は、具体的には、（a）グルココルチコイドおよびオンコスタチンMの細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、および（b）細胞外マトリクスの細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、を含む方法ということができる。そして、その具体的な態様の1つは、（a）グルココルチコイドおよびオンコスタチンMの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、および（b）細胞外マトリクスの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、を含む方法である。特に、（a）グルココルチコイドおよびオンコスタチンMの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、および（b）該細胞に細胞外マトリクスを重層して培養する工程、を含む方法により、未成熟肝細胞の分化をより効率的に誘導することができる。工程（b）においてもグルココルチコイドシグナルを活性化しておくことが好ましい。

本発明の方法に用いられる未成熟肝細胞は、増殖が可能であり、オンコスタチンM、グルココルチコイド、および細胞外マトリクスの作用により、

さらに成熟した肝細胞に分化し得る細胞を言う。ある程度成熟した肝細胞であっても、本発明の方法により、さらに成熟した肝細胞に分化させることが可能である。肝細胞の分化段階は、例えば後述のような肝マーカー遺伝子の発現レベルを基に判断することができる。本発明の方法に用いられる未成熟肝細胞は、好ましくは、OSM、グルココルチコイド、および細胞外マトリクスの作用により、成熟肝細胞、より好ましくは完全に成熟した肝細胞へ分化しうる細胞である。好適な細胞としては、例えば、増殖力の高い哺乳動物の胎児もしくは新生児由来の肝細胞が挙げられる。哺乳動物としては、ヒト、マウス、ウシなどが挙げられるが、これに制限されない。ヒトへの応用を考えた場合には、ヒト細胞が好ましい。本発明においてこれらの哺乳動物の胎児もしくは新生児由来の肝細胞を胎生肝細胞とも言う。哺乳動物胎児もしくは新生児由来の肝細胞としては、哺乳動物胎児もしくは新生児から回収した肝細胞の初代培養およびその継代細胞が好ましい。また、これらの細胞から樹立された細胞株などであってもよい。また人工的に発生させた肝細胞、組織または器官であって胎児もしくは新生児に相当する分化レベルの細胞であってもよい。

未成熟肝細胞の調製は、例えば、実施例に記載の方法に従って行うことができる。例えば組織から未分化の胎生肝細胞を調製するには、胎児肝臓などを回収してミンス後、コラゲナーゼ、ディスパーゼを含む酵素溶液〔例えば Liver Digest Medium (GIBCO-BRL社)〕で処理し細胞を分散させる。低張液によって赤血球を破壊したのち培養を行う。胎生肝細胞は強い増殖能を有しているため、培地においては、一般的な培養条件よりも高濃度の栄養分を添加すると好ましい。例えば、成熟肝細胞の培養においては、一般に、WE培地が用いられるが、本発明の培養においては、アミノ酸などの含有率の高いダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用い、さらに非必須アミノ酸 (特に、プロリン) を添加すると好適である。

胎生肝細胞は、マウスにおける胎生12～14日の肝細胞またはそれと同等の時期または性質の細胞を用いる。この時期の肝細胞は、肝実質細胞と胆管細胞の両方に分化できる能力を持つ肝前駆細胞から分化した直後の細胞であり、肝細胞としての機能は幼弱であるが、高い細胞増殖活性を保持している。胎生肝細胞としては、ヒトやその他の哺乳動物の未成熟肝細胞に由来するものであってもよい。

また、本発明の方法を適用する未成熟肝細胞は株化細胞であり得る。哺乳動物胎児もしくは新生児肝臓から調製した細胞を不死化し、本発明の方法により成熟肝細胞への分化可能な細胞を選択することにより、成熟肝細胞への分化能を保持した細胞を選択することもできる。

成熟肝細胞への分化は、肝臓特異的に発現する遺伝子または成熟段階特異的に発現する遺伝子を用いて解析することができる (Derman, E. et al. (1981) *Cell* 23, 731-739; Panduro, A. et al. (1987) *Genes Dev.* 1, 1172-1182)。アルファフェトプロテイン (AFP) は初期段階にある胎児肝のマーカーであり、肝臓の分化が進むに従って、その発現量は減少する (Shiojiri, N. et al. (1991) *Cancer Res.* 51, 2611-2620)。一方、肝細胞で生合成され、最も含有量の多い蛋白質であるアルブミンの発現は、初期胎児肝細胞 (例えばマウスE12) で始まり、成体肝細胞で最大レベルに達する (Tilghman, S. M. et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 79, 5254-5257)。妊娠後期や周産期の段階になると、肝細胞はグルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase) やチロシンアミノトランスフェラーゼ (TAT) など数多くの代謝酵素を生産し始め、肝臓の生理的役割の変化に対応する (Greengard, O. (1970) In Litwack, G. (ed.), *Biochemical Actions of Hormones*. Academic Press Inc., New York, USA, pp. 53-87; Haber, B. A. et al. (1995) *J. Clin. Invest.* 95, 832-841)。そして最終的に出生から数日後に、セリンデヒドラターゼ (SDH) とトリプトファンオキシゲナー

ゼ (T0) が肝細胞中に誘導される (Nagao, M. et al. (1986) Biochim. Biophys. Acta 867, 179-186; Noda, C. ,et al. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 168, 335-342; Noda, C. et al. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1217, 163-173)。その他、細胞の形態変化やクラスター形成、アンモニアやその他の薬剤の解毒作用などによっても肝細胞の分化を検出することができる。

すなわち、肝細胞の分化の指標としては、例えば、細胞のクラスターの形成、細胞内におけるグリコーゲンの蓄積などのほか、上記のように細胞内におけるアルブミンの産生、TAT遺伝子の発現、G6Pase遺伝子の発現、CYP2B10遺伝子の発現、アンモニアの解毒、T0遺伝子の発現、SDH遺伝子の発現などが挙げられる。本発明において未成熟肝細胞の分化とは、該細胞から成熟した肝細胞となる段階が進むことを言う。

「成熟肝細胞」とは、一般に、TAT遺伝子の発現、G6Pase遺伝子の発現、またはアンモニアの解毒の形質を有する細胞を言う。「成熟肝細胞」は、好ましくは、上記3つの全ての形質を有する細胞である。本発明は、特に完全に成熟した肝細胞を得るために有用である。本発明において「完全に成熟した肝細胞」とは、出生から数日後以降の肝細胞に特異的な少なくとも1つの形質を有することを言う。特に、トリプトファンオキシゲナーゼ (T0) が発現している肝細胞を完全に成熟した肝細胞という。該細胞は、好ましくは、さらにP450遺伝子を発現している。より好ましくは、少なくとも1つのP450酵素による解毒活性を示す細胞である。解毒活性は当業者に公知の方法により測定することができる (例えば実施例参照)。「完全に成熟した肝細胞」は、本発明において「最終分化した肝細胞」とも言う。

現在、成熟肝細胞の培養は、短期間のみ可能である。また、一般に肝癌細胞は増殖能が強く継代培養が可能であるが、肝機能を失っている。本発明の分化誘導系は、増殖能が高い胎児肝細胞等を用いて肝細胞の増幅・分

化を行うことを可能とする。本発明の分化誘導系は、特に完全に成熟した機能的肝細胞を調製するために極めて有用な方法である。

また、例えばCYP3Aサブファミリー遺伝子は胆汁酸の輸送および代謝に関与していることが報告されている。胆汁酸は、胆汁酸ホメオスタシスの維持に欠かせない多くの輸送蛋白質群および生合成酵素群の発現を調節していることが知られている (Hylemon, P.B. et al. (1994) *Prog. Liver Dis.* 12: 99-120; Bahar, R.J. et al. (1999) *Gastroenterol. Clin. North Am.* 28: 27-58)。コレステロールから胆汁酸への変換は肝臓で排他的に起こり、多数の酵素反応のカスケードを必要とする。CYP7Aは胆汁酸合成の中性経路の最初の段階に必要であり、第二の胆汁酸誘導体であるリソコリン酸 (lithocolic acid) はCYP3Aヒドロキシル化の基質となる。従って、成体肝臓において重要な機能である胆汁酸代謝を、胎生肝培養においてOSMおよびEHSにより誘導することが可能である。

本発明の方法により構築された成熟肝細胞は、人工肝臓や薬事スクリーニング等への応用が可能になると考えられる。例えば、本発明の分化誘導系を用いて得られた成熟肝細胞は、マイクロキャリアなどの支持体に付着させ、ハイブリッド型人工肝臓などを作成する上で有用である。人工肝臓の場合には、必ずしもヒト由来の肝細胞を使用する必要はないが、ヒト胎児肝からの肝細胞培養により得られた細胞は、患者に移植することで肝疾患治療に応用することが可能である。また、本発明の方法は、生体内での肝再構築への応用も可能である。

このように、本発明により細胞外マトリクスを用いて肝細胞の分化を促進することが可能となる。本発明は、細胞外マトリクスを有効成分とする、未成熟肝細胞の分化促進剤を提供する。細胞外マトリクスとしては、上記のように天然由来の細胞外マトリクスまたは人工的に合成された細胞外マトリクスであってよい。細胞外マトリクスはインテグリンおよびDDRのリ

ガンドを含むことが好ましい。これらのリガンドとしては、ラミニンおよびコラーゲンが挙げられる。これらの蛋白質を含むマトリクスは本発明の未成熟肝細胞の分化促進剤として好適に用いられる。本発明の未成熟肝細胞の分化促進剤は、細胞外マトリクス以外に他の化合物が混合されていてもよい。未成熟肝細胞の分化促進剤は、肝細胞の分化を促進するための試薬および医薬として用いることができる。試薬は試験管内アッセイなどに用いられ得る。また医薬は肝疾患の予防または治療に用いられ得る。本発明の未成熟肝細胞の分化促進剤は、特に、哺乳動物の胎児もしくは新生児由来の未成熟肝細胞を分化させ、成熟肝細胞を形成させるために有用である。本発明は、細胞外マトリクスを含む、未成熟肝細胞を分化させるための組成物（これを分化組成物ともいう）を提供する。これらの組成物は、細胞外マトリクスを薬学的に許容される媒体または担体と組み合わせて製造することができる。薬学的に許容される担体としては、細胞障害性を実質的に有さず、肝細胞分化を有意に阻害しないものであれば適宜用いることができるが、具体的には例えば、滅菌水、生理食塩水、培養液（例えばDMEMやRPMI1640等）、血清、植物油、乳化剤、懸濁剤、安定剤などが挙げられる。

また、細胞外マトリクスは、未成熟肝細胞を分化させるためのキットの要素とすることができる。例えば、グルココルチコイド、OSM、および細胞外マトリクスを含む、未成熟肝細胞を分化させるためのキットを作製することが可能である。グルココルチコイド、OSM、および細胞外マトリクスは、適宜上記のような他の媒体または担体と組み合わせることができる。また、本発明は、未成熟肝細胞の新たな培養系を提供する。培養系とは、培養を行う手段を備えた系（system）であり、例えば培養装置等である。該培養系は、それぞれグルココルチコイド、オンコスタチンM、および細胞外マトリクスの結合により誘導されるシグナル伝達を活性化させる手段を備

えている。例えば、グルココルチコイド、OSM、および細胞外マトリクスを含む培養系が例示される。このような培養系としては、培養器中の培地にグルココルチコイドおよびオンコスタチンMが含まれており、さらに細胞外マトリクスを該培地に添加し得るような培養装置が挙げられる。あるいは、培地と培養装置は、使用されるまで分離されていてもよい。

本発明の胎生肝細胞の初代培養系を用いることにより、胎生中期から成体段階への肝臓の発生過程をin vitroで再構成することが可能となった。例えば、消化管内胚葉からの肝芽 (liver bud) のin vitroでの形成を線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor; FGF)1およびFGF2が誘導することが見出されている (Jung, J. et al. (1999) Science 284: 1998-2003)。従って、FGF、OSM、およびECMsを用いることによって、初期のコミットメントから最終分化までの肝発生全ての段階をin vitroで再構成することも可能と考えられる。最近、幾つかの報告により骨髓細胞が肝細胞に分化転換できること (Petersen, B.E. et al. (1999) Science 284: 1168-1170; Lagasse, E. et al. (2000) Nat. Med. 6: 1229-1234)、さらに胚性幹細胞からアルブミンおよびTAT陽性細胞を生成できること (Hamazaki, T. et al. (2000) FEBS Lett. 497: 15-19) が示された。これらの培養系に本発明の方法を適用すれば、生成した未成熟肝細胞を最終分化した肝細胞に成熟させることが可能となる。また、生理的条件をより代表する面では、樹立細胞系よりも初代培養（またはその継代培養）の方が優れている。例えばレトロウィルスベクターを用いることにより、効率的に遺伝子を初代培養細胞に導入することができることが実証されており (Ito, Y. et al. (2000) Hepatology 32: 1370-1376)、これにより目的の遺伝子の機能を試験することが可能である。さらに、例えば肝欠損を伴うノックアウトマウスからの細胞に遺伝子を導入し、この欠損をin vitroでレスキューすることも可能である。このような方法により、肝分化・発生に關与する遺

伝子を特定したり、その機能を解析することができる。このように本発明の培養系は肝発生の機構の解明、肝再生治療、および肝疾患の予防および治療薬剤の開発に貢献することが期待される。

本発明の成熟細胞への分化誘導系は、未成熟肝細胞から成熟肝細胞への分化を調節する化合物の試験およびスクリーニングに利用することができる。即ち、上記成熟肝細胞の分化誘導系において被検試料を添加し、未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化に与える影響を検出することによって、該分化を阻害または促進するような化合物を試験およびスクリーニングすることができる。化合物の試験方法は、具体的には、(a) (i) グルココルチコイドの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、(ii) オンコスタチンMの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、および (iii) 細胞外マトリクスの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、を含む方法により未成熟肝細胞を分化させる過程のいずれかにおいて被検試料を該細胞に接触させる工程、および (b) 該未成熟肝細胞の分化を検出する工程、を含む方法である。より具体的には、(a) (i) グルココルチコイドの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、(ii) オンコスタチンMの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、および (iii) 細胞外マトリクスの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、を含む方法により未成熟肝細胞を分化させる過程のいずれかにおいて被検試料を該細胞に接触させる工程、および (b) 該未成熟肝細胞の分化を検出する工程、を含む方法により、未成熟肝細胞の分化に及ぼす化合物の効果を検出することができる。工程 (a) は本発明の未成熟肝細胞を分化させる方法により行うことができる。被検試料により分化が促進されれば、被検試料とした化合物は肝細胞分化を促進する化合物であると判断され、逆に分化が抑制されれば、肝細胞分化を抑制する化合物であると判断される。

また、この試験方法を用いて化合物をスクリーニングすることができる。具体的には、(a) (i) グルココルチコイドの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、(ii) オンコスタチンMの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、および (iii) 細胞外マトリクスの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、を含む方法により未成熟肝細胞を分化させる過程のいずれかにおいて被検試料を該細胞に接触させる工程、(b) 該未成熟肝細胞の分化を検出する工程、および (c) 被検試料非存在下で該分化を検出した場合 (対照) と比較して、該分化を抑制または促進する化合物を選択する工程を含む方法により実施することができる。より具体的には、(a) (i) グルココルチコイドの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、(ii) オンコスタチンMの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、および (iii) 細胞外マトリクスの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、を含む方法により未成熟肝細胞を分化させる過程のいずれかにおいて被検試料を該細胞に接触させる工程、(b) 該未成熟肝細胞の分化を検出する工程、および (c) 被検試料非存在下で該分化を検出した場合 (対照) と比較して、該分化を抑制または促進する化合物を選択する工程を含む方法が好適である。

上記の試験方法およびスクリーニング方法において、(i) グルココルチコイド、オンコスタチンM、および細胞外マトリクスの未成熟肝細胞への接触により誘導される各シグナル伝達を活性化させる各工程は、本発明の未成熟肝細胞を分化させる方法と同様に同時またはオーバーラップしてよく、例えばグルココルチコイドシグナルを活性化させた条件下、まずオンコスタチンMシグナルを誘導しその後細胞外マトリクスを作用させることができる。被検試料は、これらの過程のいずれのタイミングで添加してよい。スクリーニングに用いる被検試料としては特に制限はなく、例え

ば、合成低分子化合物のライブラリー、精製タンパク質、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清などが挙げられる。被検試料を系に適用するタイミングに制限はなく、始めから培養系に添加されていてもよく、あるいは培養の途中の所望の時期に添加してもよい。未成熟肝細胞の培養は、上記と同様に行うことができる。

被検試料を添加した際の未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化は、種々の指標を利用して検出することができる。このような指標としては、上記のように、例えば、細胞のクラスターの形成、細胞内におけるグリコーゲンの蓄積、細胞内におけるアルブミンの産生、TAT遺伝子の発現、およびG6Pアーゼ遺伝子の発現、CYP2B10遺伝子の発現、アンモニアの解毒、T0遺伝子の発現、SDH遺伝子の発現などが挙げられるが、これらに制限されない。

この検出の結果、被検試料の添加により、被検試料非存在下で該分化を検出した場合（対照）と比較して該分化が抑制されていれば、用いた被検試料は、成熟肝細胞への分化を抑制する化合物である（または、該化合物を含む）と判定され、一方、対照と比較して該分化が促進されていれば、用いた被検試料は、成熟肝細胞への分化を促進する化合物である（または、該化合物を含む）と判定される。

本発明の試験方法またはスクリーニング方法により同定または単離された化合物は、未成熟肝細胞の分化調節剤となる。本発明は、本発明の試験方法またはスクリーニング方法により同定または単離された化合物を未成熟肝細胞に接触させる工程を含む、肝細胞の分化調節方法を提供する。また本発明は、未成熟肝細胞の分化調節のための、該化合物の使用を提供する。またこれらの化合物は、肝細胞の増殖や分化を制御する試薬および医薬として用いることができる。これらの化合物は、例えば機能的肝細胞を大量調製する際に、肝細胞の増殖や分化を制御するために有用であり、ま

た、肝関連疾患の予防薬や治療薬の候補ともなる。本発明の試験方法またはスクリーニング方法により同定された化合物は、有効成分以外に適宜他の溶質や溶媒と組み合わせて組成物とすることができる。本発明における未成熟肝細胞の分化調節剤には、このような組成物も含まれる。

本発明の薬剤を医薬として適用する場合、その適用対象としては、例えば慢性肝炎やアルコールの過剰摂取などによる肝炎、肝硬変、肝不全等の肝機能の低下を伴う疾患、および肝臓などの難治疾患が挙げられる。

本発明の未成熟肝細胞の分化調節剤は、培養細胞に適用する場合には、一般的に、肝細胞の分化を調節するために十分な有効濃度を培地等の培養系に添加される。また、患者に投与する場合には、上記の培養細胞における有効濃度などを基にして算出した治療学的有効量を投与すればよい。但し、投与量は、患者の体重、年齢、症状、投与方法、薬剤の有効成分の毒性などの諸要因を考慮して適切に定める必要がある。一般的な投与量は、薬剤の有効血中濃度や代謝時間等により異なるが、熟練した医師であれば適当な投与量を適宜選択することができる。

本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を医薬品として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、安定剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。本発明の医薬組成物は、水溶液、錠剤、カプセル、トローチ、バッカル錠、エリキシル、懸濁液、シロップ、点鼻液、または吸入液などの形態であり得る。化合物の含有率は適宜決定すればよい。患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射、経口投与、鼻腔内注入、経気管支投与、筋肉内投与、その他の当業者に公知の方法により行いうる。投与は1回から数回に

分けて行うことができる。また、該化合物がDNAまたはRNA等の核酸によりコードされうるものであれば、該核酸を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、OSM存在下または高密度培養下におけるT0、TATの発現誘導を示す写真である。

E14の肝臓由来の胎生肝細胞を、グルココルチコイド非添加 (Dex-) または添加の状態で、10ng/ml OSMを添加して7日間培養したもの (+OSM)、さらに培養開始5日後からEHSを添加して2日間培養した細胞 (+EHS) から total RNA を回収して、ノーザンブロットによって T0、TAT の発現を検出した。グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) を内部対照とした。TATに関しては、グルココルチコイド (Dex) の存在下、OSMまたはEHS添加によってその発現は誘導され、高密度培養によっても誘導されるが、T0の発現は全く見られなかった。”なし”；OSM非添加, ”OSM”；OSM添加, ”低密度”；低密度培養, ”高密度”；高密度培養, ”新生仔”；新生仔マウス, ”成獣”；成獣マウス。

図2は、EHSゲルの添加によるT0の発現誘導を示す写真である。

A 標準的な培養条件を以下に示す。コラゲナーゼで分散させた胎仔肝臓細胞をゼラチンコートしたディッシュで7日間培養した。肝成熟にはグルココルチコイドが必要であるので、図2および4～6の全ての培養で 10^{-7} M のDexを添加した。0～5日目の間、肝成熟の誘導剤としてOSM (10ng/ml) を添加した。その後5日目に培地を除き、肝細胞培養培地でEHSゲルを重層した。7日目に肝特異的遺伝子の発現を解析した。B E14の胎生肝細胞を低密度 (low density) (レーン1=2) または高密度 (high density) (レー

ン3-6) 条件下、グルココルチコイド (Dex) 存在下で、OSM非添加または添加して5日培養した。その後培養液を除き、EHSゲルを添加し 2日間培養した。各試料から得た10 μ gの全RNAを用いて、TAT、T0、およびGAPDHの発現をノーザンブロッティングにより解析した。OSM単独ではT0の発現は見られないのに対し、OSMで成熟を誘導した細胞をさらにEHSで刺激することでT0の強い発現誘導が見られることがわかった。特に高密度条件下で強い誘導が引き起こされた。C 高密度培養条件で、Dex、またはDex+OSMで5日間培養した細胞をEHSを重層することによりそれぞれ 6、12、24、48 h 刺激し、T0、TATの発現を解析した。各試料の全RNAを用いたノーザンブロッティングにより、肝分化マーカーの発現を調べた。T0の発現誘導を引き起こすためには、24h程度のEHS刺激が必要であることが明らかとなった。D 細胞をDexまたはDex+OSM存在下で 3 (レーン1-3)、5 (レーン4-6)、および7 (レーン7-9) 日間高密度培養し、その後2日間、EHSゲルを添加して最終分化を誘導した。T0の発現が有意に誘導されるには、OSMによる5日以上での成熟誘導が必要とされた。"なし"; OSM非添加, "OSM"; OSM添加, "低密度"; 低密度培養, "高密度"; 高密度培養, "新生仔"; 新生仔マウス, "成獣"; 成獣マウス。

図3は、グルココルチコイド、インシュリン、グルカゴンの胎生肝細胞への反応性を示す写真である。

E14の胎生肝細胞を、DexおよびOSM存在下、OSM/EHSのみ添加、Dex/OSM/EHSの3種の添加の条件でそれぞれ培養した。Dexの非存在下では、OSMおよびEHS刺激があっても T0、TAT の発現は全く見られないことから、グルココルチコイドが胎生肝細胞の成熟に必須であると考えられる。一方、インシュリンを添加しない条件 (図中 "なし") では、通常の場合 (ITSを含む) に比べTATおよびT0の発現が強く誘導され、逆に 5×10^{-7} M グルカゴン添加 (+Glu) によっても、T0、TAT の発現が強く誘導された。

図4は、EHSゲルによるP450ファミリー遺伝子の発現誘導を示す写真である。

A OSMおよびEHSの刺激により誘導されるP450遺伝子の発現をノーザンブロットリングにより調べた。胎生肝細胞をOSM非添加または添加して5日間高密度培養し、EHSゲルを重層してさらに2日間まで培養し、最終分化を誘導した。EHSゲルを重層して6、12、24、および48時間後に調製した全RNAを用いてノーザンブロット解析を行った。CYP2B10やCYPcbはOSM添加単独ではほとんど発現は誘導されないのに対し、EHSゲルの添加によって強い発現誘導が見られることがわかった。B OSMおよびEHSによる刺激によりCYP活性が誘導されることを示す。胎仔肝臓細胞をOSMの非存在下または存在下で6日間培養し、その後100 μ MのBFCを非存在下（刺激なし）または存在下（刺激あり）で24時間細胞にEHSを重層した。培養液を100 μ MのBFCを含む新しい培地に交換し、1時間インキュベートした後、培養液を回収してHFC量を蛍光スペクトロメーターにより決定した。細胞をOSMおよびEHSで刺激すると、P450の活性はOSM単独で誘導される場合の2～2.5倍になった。各値は3連のアッセイにおける平均およびS.D.を示す。“なし”；OSM非添加，“OSM”；OSM添加，“新生仔”；新生仔マウス，“成獣”；成獣マウス。

図5は、EHSゲルによる胎生肝細胞の成熟誘導と化学物質による肝機能促進との比較を示す写真である。

胎生肝細胞を分離し、Dex、またはDex+OSM存在下で高密度培養した。EHSゲル刺激（培養開始後5日目より）、1% DMSO刺激（培養開始後2日目より）、または3mM phenobarbital (PB) 刺激[培養開始後1日目(1d)、または5日目(5d)より]を行い、培養開始から7日目にT0、TATの発現誘導をノーザンブロットリングにより比較した。DMSO刺激によってEHSと同程度のTATの発現は誘導されたが、T0の発現はEHSゲル刺激以外では見られなかった。“なし”；OSM非添加，“OSM”；OSM添加，“新生仔”；新生仔マウス，“成獣”

；成獣マウス。

図6は、Integrin β 1中和抗体によるEHSゲル誘導性の肝成熟の抑制を示す写真である。

胎生肝細胞を分離、OSM存在下または非存在下で5日間高密度培養し、OSM非存在下または存在下で培養した細胞にEHSゲルを添加した。EHSゲルの添加時に Integrin β 1中和抗体 (β 1) またはそのアイソタイプコントロール抗体 (IC) を添加した後、2日後に細胞を回収してノーザンブロット解析によりEHSが誘導するTATおよびT0の発現を解析した。OSM非存在下でEHSゲル刺激によって誘導されるTATの発現誘導が、Integrin β 1中和抗体の添加によって顕著に抑制された。対照抗体を用いた場合は、阻害は見られなかった (A)。それに対し、OSMおよびEHSにより誘導されるT0の発現は、抗 Integrin β 1抗体により阻害されなかった (B)。"なし"; OSM非添加, "OSM"; OSM添加, " β 1"; Integrin β 1中和抗体, "IC"; アイソタイプコントロール。

発明を実施するための最良の形態

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、本明細書において引用された文献は全て本明細書に組み込まれる。

1. 材料

本実施例で使用したマウス (C57BL/6CrSlc) は日本SLC (Shizuoka, Japan) から購入した。Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、ウシ胎仔血清 (FCS)、Liver Perfusion Medium、Liver Digest Medium、MEM non-essential amino acid solution、Insulin-Transferrin-Selenium X (ITS) は GIBCO-BRL社 (Rockville, MD) から購入した。デキサメタゾン (Dex) はSigma (St. Louis, MO) より購入した。マウスOSMはR&D Systems社 (

Minneapolis, MN) から購入した。EHS (Growth Factor Reduced Matrigel Matrix; 増殖因子を減少させたマトリゲルマトリックス) は Becton Dickinson (Bedford, MA) より購入した。抗 Integrin $\beta 1$ 抗体 (Ha2/5) は Pharmingen (San Diego, CA) より購入した。

2. 細胞培養

胎生14日 (E14) マウス肝臓由来の胎生肝細胞は文献記載の方法により培養した (Kamiya, A. et al. (1999) EMBO J. 18: 2127-2136; Kinoshita, T. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7265-7270)。具体的には、胎生14日のマウス肝臓を Liver Perfusion Medium 内でミンス後、コラゲナーゼ、ディスパーゼを含む酵素溶液である Liver Digest Medium で処理し細胞を分散した。低張液によって赤血球を破壊したのち、0.1%ゼラチンコートした培養ディッシュを用いて、DMEM培地 (10% FCS, 2 mM L-glutamine, 1×ITS, 50 μ g/ml gentamycin, 10^{-7} M dexamethazone [Dex], 1×non essential amino acids を含む) (これを肝細胞培養培地とも言う) で培養した。数時間後、血球細胞や死細胞を洗い流した後に、サイトカイン等 (10ng/ml OSM または 10ng/ml HGF) を添加して数日間培養した。これを各実施例において使用した。培地は2日おきに交換した。培養開始する細胞数は、Falcon 6 well dish の1 well に 2×10^5 cell (低密度培養時) または 6×10^5 cell (高密度培養時) で培養を行った。培養した肝細胞は自律的に増殖し、G6PaseやTATなどのような分化マーカーを発現しておらず、この段階ではin vivoにおける胎児肝細胞の特徴を有していた。

OSM刺激は、培地中にマウスOSMを10ng/mlの濃度で添加することにより行った。EHSゲル添加は、胎生肝細胞を数日間培養した後に培地を除き、氷冷した肝細胞培養培地で 1/5 に薄めたEHSゲル (0.362 mg/ml) を細胞に上層し、37°Cでインキュベーションして固化させた。対照培養は氷冷した肝細胞

胞培養培地のみとした。その後2日間培養し、細胞を回収した。in vitroでの肝分化はグルココルチコイド (Dex) を必要とするため、特に断らない限り 10^{-7} M のDexを培地に加えた (Kamiya, A. et al. (1999) EMBO J. 18: 2127-2136)。

3. ノーザンブロット解析

肝細胞における遺伝子発現はノーザンブロッティングにより解析した。Total RNAは、細胞または組織から Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform (AGPC) 法を用いて抽出した (Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159)。10 μ gの Total RNA を 2% ホルムアルデヒドを含む 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、RNAをナイロンメンブレン (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) にトランスファーした。UV照射でRNAを固定した後、高SDS緩衝液 (7% SDS、50% ホルムアミド、5 \times SSC、2% ブロッキング剤 (Boehringer Mannheim)、50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)、0.1% N-ラウロイルサルコシン) 中、rTaq DNAポリメラーゼで生成させた digoxigenin (DIG) ラベルプローブを用いて、48 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。検出は、アルカリホスファターゼでラベルされたDIG抗体 (Boehringer-Mannheim) とCDP-star reagent (New England Biolabs, Beverly, MA) によって行った。

4. チトクロームP450活性の測定

E14マウス胎生肝細胞をOSM存在下または非存在下で6日間培養し、100 μ Mの 7-Benzylloxy-4-trifluoromethyl-coumarin (BFC) (Gentest, Woburn, MA) の非存在下または存在下で1日間EHSゲルを重層した。その後培地を除去し、100 μ MのBFCを含む培地で細胞を1時間インキュベートした。細胞のP450活性により、非蛍光のBFCは蛍光を発する 7-Hydroxy-4-trifluoromethyl-coumarin (HFC) に変換された。培養から培地を回収し、スペクトロフルオロメーターを用い、励起波長 409nm および蛍光波長 530nmにてHFC

濃度を測定した。

【実施例 1】 胎生肝細胞と肝非実質細胞との共培養

肝細胞が最終分化する胎生後期から出生以降の時期は、肝臓が造血器官から代謝器官へと構造変化していく時期にあたる。肝実質細胞が成熟し様々な酵素発現を開始すると同時に、肝臓を構成するそれ以外の細胞（肝非実質細胞：類道壁内皮細胞、星細胞、クッパー細胞など）が増殖し、成体の肝臓構造を構築していく。最近、この非実質細胞と肝細胞との細胞間相互作用が肝機能に重要であることが、成体の肝細胞を用いた研究で明らかにされつつある（Bhatia, S.N., et al., FASEB J., 13, 1883 (1999) Review）。しかし、胎生期における非実質細胞の役割は未だ不明であり、肝非実質細胞を分離して胎生肝細胞との共培養を行うことで、非実質細胞の肝前駆細胞分化に与える影響を解析した。

成体マウス肝臓をコラゲナーゼで灌流分離し、非実質細胞のみを遠心分離によって得た。この細胞を胎生肝細胞初代培養系に添加し、肝細胞の増殖、分化に与える非実質細胞の影響を観察した。その結果、肝細胞の増殖の誘導は見られるものの、肝機能の成熟を促進する活性は見られなかった。

【実施例 2】 OSM添加、高密度培養によるT0の発現の欠如

これまでの報告で本発明者らは、OSMを培養系に添加することで胎生肝細胞の成熟を促進することを示している（Kamiya, A. et al. (1999) EMBO J. 18, 2127-2136）。また、胎生肝細胞を高密度培養することで肝機能の一部を誘導できた（Kojima, N. et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277, 152-158）。そこで、10ng/ml OSM存在下で7日間高密度培養することにより、T0の発現が誘導できるか解析した（図1）。その結果、TATはOSM添加、高密度培養の各条件で誘導され、高密度下でのOSM添加によってその発現が増大した。しかし、この条件でもT0の発現は全く見られなかった。

。つまり、TATの発現など、新生児期までの遺伝子発現は今までの条件で誘導できるものの、肝細胞の最終分化には他の因子が必要であると思われた。

〔実施例 3〕 EHSゲルによる肝細胞の最終分化誘導

胎生肝細胞の最終分化を刺激する分子を検索するため、本発明者らは OSM、HGF、およびTGF- β などのさまざまなサイトカインおよび可溶因子を試験した。しかしながら、これらの因子や、それに加え細胞間相互作用によっても、この培養系においてT0の発現は誘導されなかった。液性因子以外に、肝細胞の機能を左右するものとして、本発明者らは細胞外マトリクス (ECM) に注目した。ECMは成体肝細胞の肝機能の調節に重要な役割を果たしている (Schuetz, E.G. et al. (1988) J. Cell Physiol. 134: 309-323; Matsushita, N. et al. (1994) Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 1514-1516; Ben-Ze'ev, A. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2161-2165; Oda, H. et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 212: 800-805; Bissell, D.M. et al. (1987) J. Clin. Invest. 79: 801-812)。胎生後期および周産期では造血が肝臓から骨髄に移行し、肝臓は成熟肝の機能を獲得し始める (Orkin, S.H. (1996) Curr. Opin. Genet. Dev. 6: 597-602; Miyajima, A. et al. (2000) Cytokine Growth Factor Rev. 11: 177-183)。また、新生児期以降の肝臓は、造血器官としての機能が終わり代謝器官としての構造構築が始まっている時期であり、非実質細胞である星細胞 (stellate cells) や類洞内皮細胞 (sinusoidal endothelial cells) などが増殖してくる (Enzan, H. et al. (1997) Microsc. Res. Tech. 39: 336-349)。星細胞は、脂肪の蓄積の他、細胞外マトリクスの合成等の機能 (Weiner, F.R. et al. (1990) Hepatology 11: 111-117) を果たしており、本発明者らは、胎生肝細胞の最終分化過程に細胞外マトリクスが関与している可能性を考えた。そこで、5日間、OSM添加または

非添加で低または高密度培養した肝細胞にEHSゲルを上層に添加してさらに2日間培養した。この培養からtotal RNAを抽出し、ノーザンブロット解析によりTATおよびT0の発現を調べた(図2A)。その結果、EHSの添加によってT0の発現が誘導されることがわかった(図2B)。OSMの添加によりEHSによるT0の発現が強く誘導され、特に、高密度培養下でOSM添加、その後EHSを重層した培養系で最もT0の発現が強く、3種の条件、すなわちOSM、EHS、および高い細胞密度がそろって最大の肝成熟誘導が得られることがわかった。この結果から、細胞外マトリクスが肝機能を促進すること、特にOSMとのシナジーによって、胎生肝細胞の最終分化を誘導できることが明らかとなった。

図2Cに示すように、EHSによるT0の発現誘導はEHSの添加後12~24時間が始まり、より強い誘導には24時間~48時間の刺激が必要であった。また、OSMで刺激している培養時間が3日間までの培養物では、その後EHSを添加してもT0の発現誘導が見られないことから、EHSによって肝細胞の最終分化を誘導するには、先にOSMによって3日より多い期間刺激することにより肝成熟をあるレベルまで促進することが好ましいと考えられる(図2D, レーン1~3)。

胎生肝細胞を、Dexのみ、DexおよびOSM添加の条件で5日間培養した後、EHSゲルを添加して2日間培養した。DexおよびOSMの添加によって、細胞質内器官が非常に発達し、核がはっきり見られるような成熟した肝細胞のクラスターが観察されるが、EHSゲルの添加によってそれがさらに強められることが判明した。さらにrhodamine-phalloidinを用いてアクチンの染色を行った。その結果、EHSを添加していない細胞では、stress actinが細胞全体に見られるのに対し、EHSの添加によってアクチンがcell peripheryへと局在しており、細胞の極性がEHSによって誘導されていると考えられる。

〔実施例4〕 EHSによる肝最終分化におけるホルモンの制御

TAT、T0などの肝機能を司る遺伝子の発現は、成熟肝細胞では様々なホルモンによって制御されていることが既に知られている。そこで、EHSによって試験管内で最終分化させた胎生肝細胞でも、成体の肝細胞と同様にホルモンによって遺伝子発現が制御されているのかどうか解析を行った。

胎生肝細胞を、ITSを含む培地を用いて、OSMの存在下、あるいはOSMおよびDexの存在下で5日間培養した後、インシュリンを含まない条件、インシュリン ($1 \times \text{ITS}$) を含む条件、もしくは $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ グルカゴンを含む条件の各条件においてEHSを添加して2日間培養した。その結果、T0、TATの発現誘導にはグルココルチコイドの添加が必要であり、また、インシュリンの添加で発現が抑制され、逆にグルカゴンの添加によって発現が誘導された(図3)。これは成熟肝細胞で見られるホルモンの制御機構と同じものである。特に、OSM、EHS、およびグルカゴンの添加によって *in vivo* の成体肝に近いレベルまでT0の発現を誘導できることがわかり、この培養系が肝細胞の最終分化過程に達していると考えられた。

[実施例5] EHSによる解毒系酵素の発現および活性の誘導

成体の肝臓は、代謝系酵素や血漿蛋白質の合成以外に、アルコール、薬物等の解毒作用という重要な機能を担っている。このような機能を担う蛋白質の一群であるP450チトクロームはCYP遺伝子群によりコードされるヘム含有モノオキシゲナーゼのスーパーファミリーである(Nelson, D.R. et al. (1996) Pharmacogenetics 6: 1-42)。これらの酵素の大半は薬剤、外来化合物、およびステロイドなどの内因性基質の酸化的代謝に関与している。*in vivo*における新生児期の肝臓では、肝の発生に伴って肝細胞は多くのP450遺伝子を発現し始めるが、OSM存在下で高密度培養を行う培養系では、これらの遺伝子の発現はほとんど見られない(図4A)。そこで、試験管内でOSMおよびEHSで最終分化を誘導した胎生肝細胞で、*in vivo*と同様に解毒系の酵素群の発現が誘導されるかを解析した。

OSM存在下でE14.5胎生肝細胞を5日間高密度培養し、その後EHSによって最終分化を誘導したところ、CYP2B10、CYP3a、CYPcbといった解毒系の酵素群の発現が誘導されていることがわかった(図4)。この活性はT0の時と同様で、EHS刺激開始後12時間から誘導が見られ、24~48時間の刺激で強い発現誘導が見られた。このことから、肝細胞の最終分化誘導にしたがって解毒等の肝機能も誘導されていると考えられる。

解毒に必要とされるP450酵素の活性を実際に調べた。E14胎生肝細胞をOSMの非存在下または存在下で6日間高密度培養し、その後EHSを24時間重層した。BFCは主にCYP3Aファミリーの酵素によって代謝され蛍光HFCに変換される(Renwick, A.B. et al. (2000) *Xenobiotica* 30: 955-969; Stresseur, D. M. et al. (2000) *Drug. Metab. Dispos.* 28: 1440-1448)。HFCの濃度をスペクトロフルオロメーターを用いて測定した。Dexのみで刺激した細胞では、HFC量に有意な違いは見られなかったが、OSM刺激はP450活性を有意に誘導した(図4B)。細胞をOSMおよびEHSの両方で刺激した場合、P450の活性はOSMのみで誘導される2~2.5倍に達した。それに加え、CYP3A活性はBFCでブレインキュベートすると有意に上昇した。そこで、胎生肝細胞にEHSを重層して24時間培養する際に100 μ MのBFCを共存させた。図4Bに示したように、これら全ての条件においてHFC量が増加することが判明した。特にOSMおよびEHSにより誘導される活性は、やはり、OSMのみで誘導される活性の2~2.5倍であった。これらの結果から、重要な肝機能の一つである解毒能が、EHSによりインビトロで胎生肝細胞に付与されることが明らかとなった。

〔実施例6〕 化学物質による肝細胞分化の誘導とEHSによる最終分化誘導との比較

成熟肝細胞を分離培養すると、生体内と比べて肝機能は著しく低下する。この低下を抑制するものとして、化学物質である dimethylsulfoxide (D

MSO) や phenobarbital (PB) などが作用することが以前の報告で示されており、例えばDMSOを添加した特定の培地で細胞を培養することにより *in vitro* で成熟肝細胞の機能を維持できることや、PBが成獣ラットの肝細胞の増殖を抑制し、成体肝細胞の形態および遺伝子発現を維持することが知られている (Isom, H.C. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3252-3256; Baribault, H. et al. (1986) J. Cell Physiol. 129: 77-84; McGowan, J.A. (1988) J. Cell Physiol. 137: 497-504; Mizuguchi, T. et al. (1998) J. Cell Physiol. 174: 273-284; Mitaka, T. et al. (1993) In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 29A, 714-722; Miyazaki, M. et al. (1998) Exp. Cell Res. 241, 445-457)。そこで、EHSによる肝成熟誘導とこれらの化学物質の作用が同じシグナル経路によるものかどうかを比較検討した。

E14.5胎生肝細胞をOSM存在下で高密度培養し、培養開始後2日 (DMSO)、または 1もしくは5日後 (PB) に添加した (図5)。その結果、DMSO刺激ではOSMによるTATの発現誘導は顕著に増強されるものの、T0の発現誘導に関しては全く見られなかった。この結果はDMSOは幾つかの肝分化マーカー遺伝子の発現を誘導できるものの、最終分化は誘導できないことを示している。また、PB刺激では、培養1日後、および5日後の双方とも添加による肝特異的遺伝子の発現に対する効果は見られなかった。以上の結果から、EHSによる胎生肝細胞の成熟誘導は、化学物質による肝機能の誘導とは全く違った経路によって制御されていることが明らかとなった。

[実施例7] Integrin β 1を介したEHSによる肝成熟誘導

EHSなどの細胞外マトリクスは、細胞表面に存在するさまざまな受容体因子と結合し、シグナルを細胞内に伝達することで細胞増殖、分化などに影響を与えている。例えば、ECM分子に対する膜受容体の成分としてインテグリンファミリー蛋白質が挙げられる。インテグリンは α および β サブユニ

ットのヘテロダイマーからなり、EHSの主成分であるコラーゲンtype IVやラミニンなどのECM分子に対する受容体として働く。特にEHSの主要な成分であるラミニンの受容体として詳細に解析されているインテグリンファミリーとしては $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 7\beta 1$ 、 $\alpha 9\beta 1$ 、および $\alpha 6\beta 4$ インテグリンが含まれる (Mercurio, A. (1995) Trends Cell Biol. 5: 419-423)。例えばインテグリン $\alpha 3\beta 1$ はラミニンおよびコラーゲンへの肝細胞の接着およびアルブミンmRNAの発現に重要である (Lora, J.M. et al. (1998) Hepatology 28: 1095-1104)。インテグリンはECMの応答して、各グループに共通する細胞内シグナル伝達経路のみならず、サブグループに特異的なシグナル伝達経路も活性化する。そこで、EHSによる肝最終分化誘導に関与する分子機構を明らかにするために、コラーゲン、ラミニンの受容体の大半で共通する成分である Integrin $\beta 1$ に対する中和モノクローナル抗体を用いて解析を行った。胎生肝細胞を5日間OSM非存在下で高密度培養した後、EHSを添加して2日間インキュベートすると、非添加の場合と比べて強いTATの発現が誘導されることがわかった。この条件下で、Integrin $\beta 1$ 抗体 (Pharmingen Ha2/5) を 10~30 $\mu\text{g/ml}$ でEHSと同時に添加したところ、この活性が強く抑制された (図 6 A)。つまり、EHSゲルによって誘導されるTAT発現機構の少なくとも一部は Integrin $\beta 1$ を介していることが示された。従って、インテグリンにより誘導されるシグナルは、OSMシグナルなどと共に協調的に肝細胞の成熟を促進している可能性がある。興味深いことに、インテグリン $\beta 1$ に対する抗体はOSMおよびEHSで誘導されるTATおよびT0の発現を阻害しなかった (図 6 B)。胎生肝細胞をOSM存在下で5日間培養後、Integrin $\beta 1$ 抗体 30 $\mu\text{g/ml}$ とIntegrinファミリーの阻害剤であるRGDペプチド (Calbiochem, 50ng/ml) とを、EHSと同時に添加して2日間培養したのち、T0の発現を解析したところ、T0の発現誘導に対する抑制効果はほとんど見られなかった。このことから、EHSゲルによって誘導

される肝成熟過程には、Integrin非依存的なシグナル経路も同時に作用していると考えられる。すなわち、細胞外マトリクスによるシグナルは、Integrin依存的、非依存的経路の双方が肝細胞の最終分化過程に関与していると考えられる。そして、EHSによる胎生肝細胞の最終分化はインテグリン $\beta 1$ 非依存的シグナルで十分であり、インテグリン $\beta 1$ とは独立に誘導することができることが示唆された。

産業上の利用の可能性

本発明により、未成熟肝細胞を最終分化した成熟肝細胞へ分化させる方法が提供された。本発明の方法によれば、胎生肝細胞から簡便かつ大量に機能的な肝細胞を調製することができる。本発明の分化誘導系は、肝機能のアッセイ系として肝関連疾患の医薬品候補化合物のスクリーニング等において有用である。さらに、肝炎ウィルスの感染モデル系として使用することで、抗ウィルス薬のスクリーニングにも有効である。また、本発明の分化誘導系により得られた成熟肝細胞は、人工肝臓への応用が期待される。

成体の肝細胞を用いた人工肝臓は、すでに劇症肝炎などへの応用が始まっており、自己再生または移植までの間、肝機能を代行することで肝難治疾患の治療を可能とすることが期待されている。しかし、現在用いられている成体肝細胞では、体外に分離し試験管内で分離培養すると、急速に生体内での機能を失い、また増殖性が弱いために多数の細胞を必要とするなどの欠点がある。一方、胎生肝細胞は、成熟した肝細胞と違い強い増殖能力をもつ反面、成熟肝としての機能はほとんど保持していない。肝細胞の増殖、分化、成熟を自由に制御するシステムの開発は人工肝臓を実用化するためには必須の課題である。本発明により、強い増殖能力をもつ胎生肝細胞（またはその細胞株）を増殖させた後に肝機能を誘導することにより

、従来の成体肝細胞を用いた系での欠点を克服することが可能となる。また、胎生肝細胞だけでなく、成体肝の中に存在している肝ステムセルを分化、成熟させ細胞移植等に利用できる可能性もある。

請求の範囲

1. 未成熟肝細胞を分化させる方法であって、(a) グルココルチコイドの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、(b) オンコスタチンMの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、および(c) 細胞外マトリクスの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、を含む方法。
2. 請求項1に記載の方法であって、(a) グルココルチコイドの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、(b) オンコスタチンMの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、および(c) 細胞外マトリクスの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、を含む方法。
3. 工程(c)が、細胞外マトリクスを含むゲルを未成熟肝細胞に重層して培養する工程である、請求項3に記載の方法。
4. 未成熟肝細胞が哺乳動物の胎生肝細胞である、請求項1から3のいずれかに記載の方法。
5. 細胞外マトリクスがラミニンおよび/またはコラーゲンを含む、請求項1から3のいずれかに記載の方法。
6. 請求項1から3のいずれかに記載の方法により調製された成熟肝細胞。
7. 細胞外マトリクスを有効成分とする、未成熟肝細胞の分化促進剤。
8. 細胞外マトリクスがラミニンおよび/またはコラーゲンを含む、請求項7に記載の未成熟肝細胞の分化促進剤。
9. 未成熟肝細胞が哺乳動物の胎生肝細胞である、請求項7または8に記載の分化促進剤。
10. 未成熟肝細胞の分化に及ぼす化合物の効果を試験する方法であって

(a) (i) グルココルチコイドの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、(ii) オンコスタチンMの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、および (ii i)細胞外マトリクスの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、を含む方法により未成熟肝細胞を分化させる過程のいずれかにおいて被検試料を該細胞に接触させる工程、および

(b) 該未成熟肝細胞の分化を検出する工程、を含む方法。

11. 未成熟肝細胞の分化を抑制または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (i) グルココルチコイドの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、(ii) オンコスタチンMの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、および (ii i)細胞外マトリクスの未成熟肝細胞への接触により誘導されるシグナル伝達を活性化させる工程、を含む方法により未成熟肝細胞を分化させる過程のいずれかにおいて被検試料を該細胞に接触させる工程、

(b) 該未成熟肝細胞の分化を検出する工程、および

(c) 被検試料非存在下で該分化を検出した場合（対照）と比較して、該分化を抑制または促進する化合物を選択する工程を含む方法。

12. 工程 (a) が、(i) グルココルチコイドの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、(ii) オンコスタチンMの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、および (iii) 細胞外マトリクスの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、を含む方法により未成熟肝細胞を分化させる過程のいずれかにおいて被検試料を該細胞に接触させる工程である、請求項10または11に記載の方法。

13. 工程 (a) の (iii) が、細胞外マトリクスを含むゲルを未成熟肝細胞

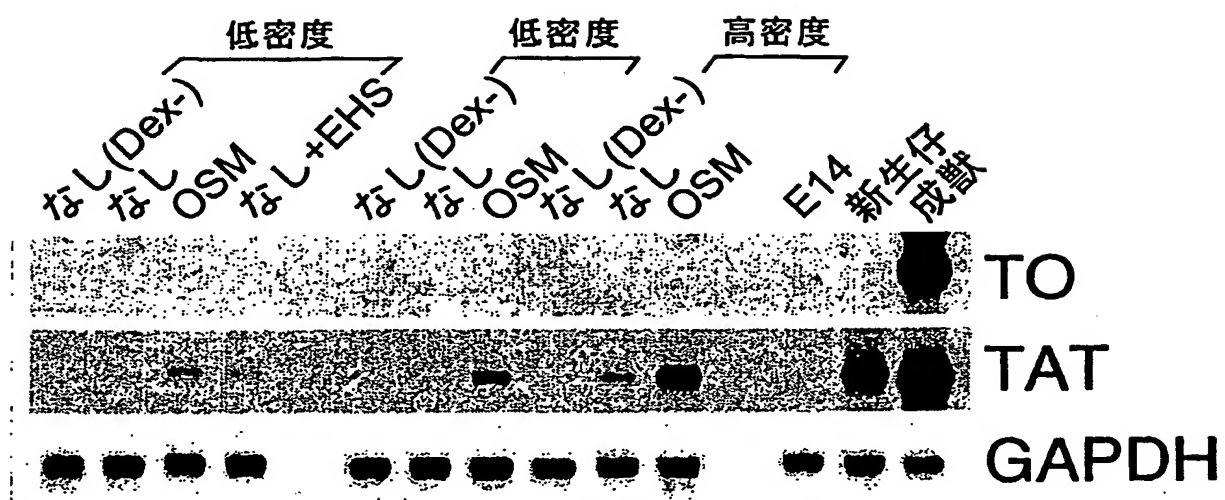
胞に重層して培養する工程である、請求項 1 2 に記載の方法。

1 4 . 細胞外マトリクスがラミニンおよび/またはコラーゲンを含む、請求項 1 0 または 1 1 に記載の方法。

1 5 . 未成熟肝細胞が哺乳動物の胎生肝細胞である、請求項 1 0 または 1 1 に記載の方法。

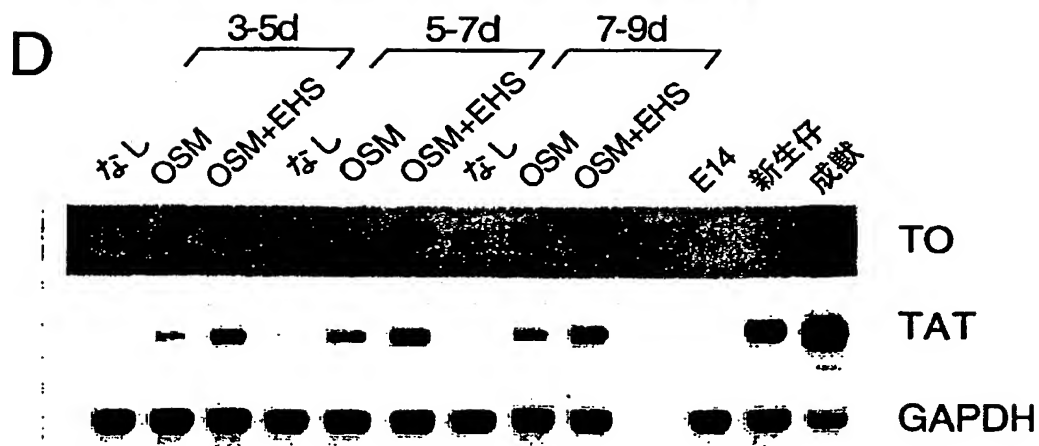
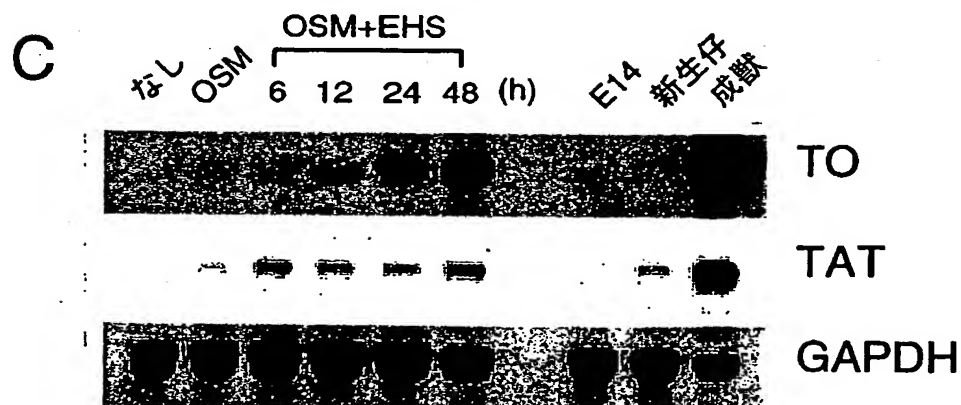
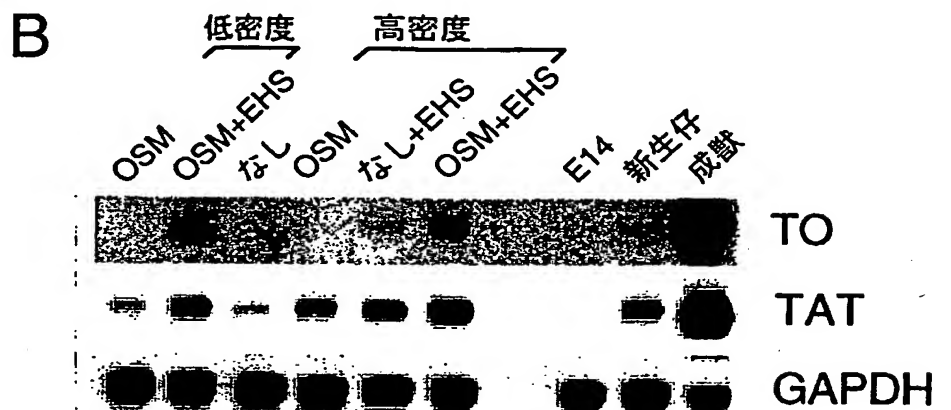
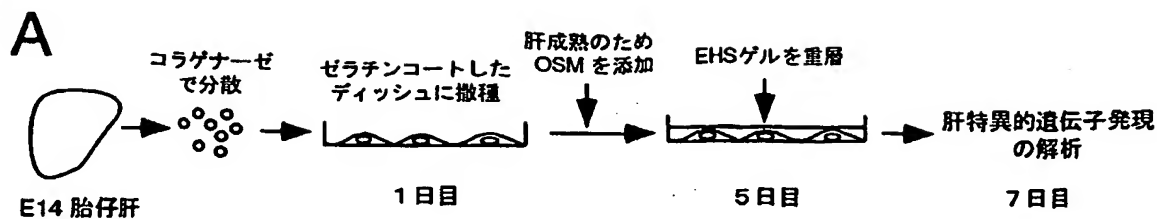
1 6 . 請求項 1 0 または 1 1 に記載の方法により同定または単離する化合物を含む、未成熟肝細胞の分化調節剤。

图 1



2 / 6

図 2



3 / 6

☒ 3

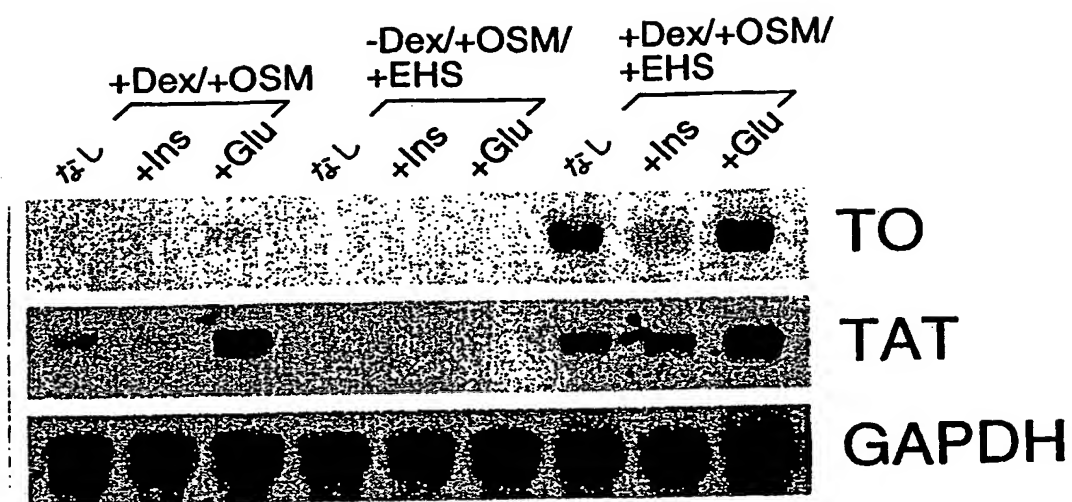


図4

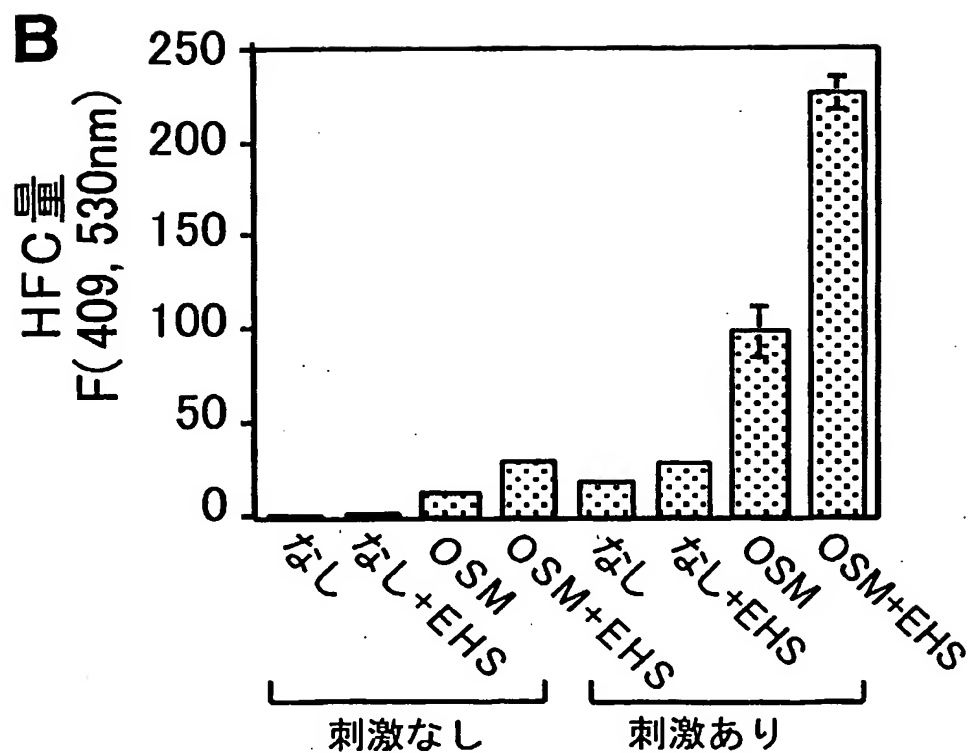
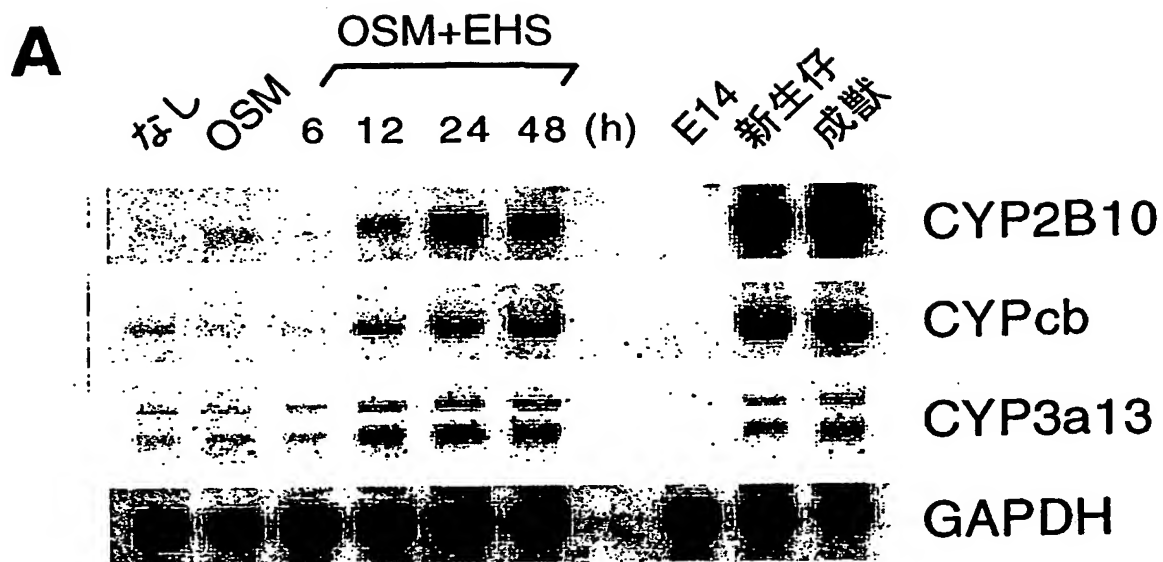


図 5

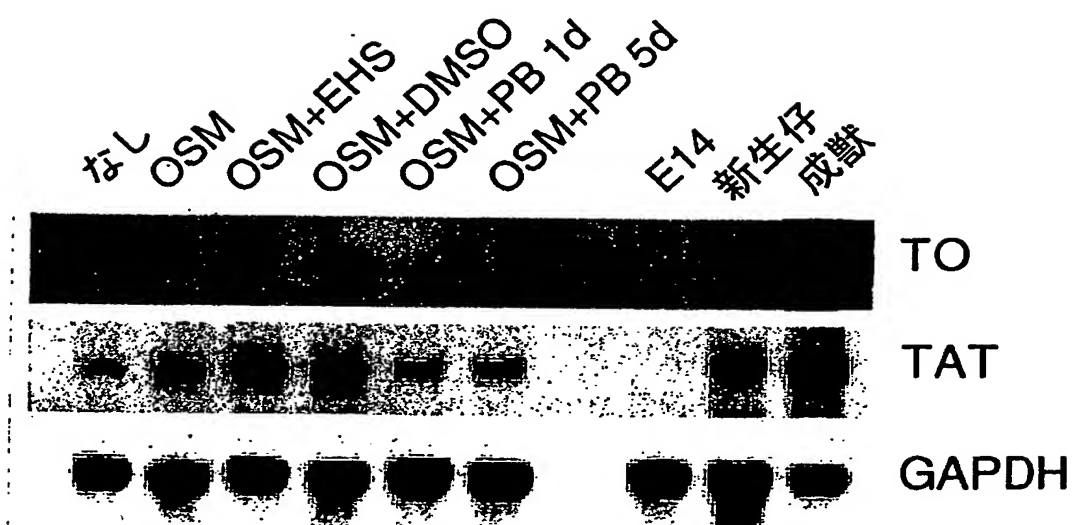
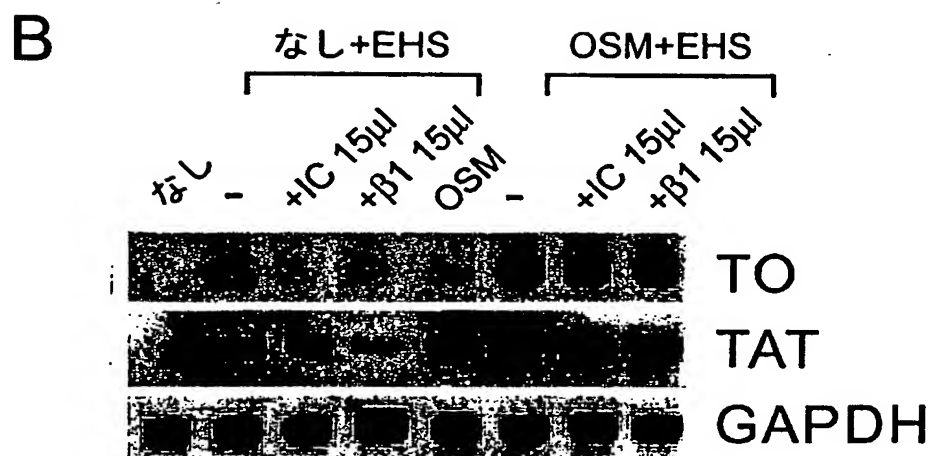
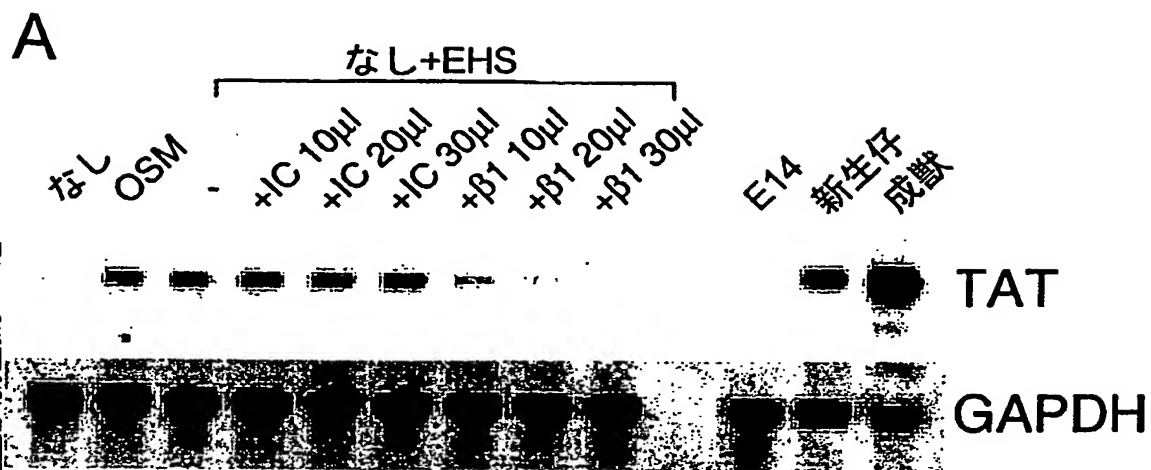


図 6



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2001年11月22日（22.11.2001）木曜日 11時59分14秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 財団法人神奈川科学技術アカデミーは、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2000年11月25日（25.11.2000）
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	第23回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10236

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N5/02, C12Q1/02, A61K38/17, A61K45/00, A61L27/00, A61P1/16, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N5/02, C12Q1/02, A61K38/17, A61K45/00, A61L27/00, A61P1/16, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN) WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Toshihiro MITAKA et al., Reconstruction of Hepatic Organoid Small Hepatocytes and Hepatic Nonparenchymal Cells., HEPATOLOGY (1999), Vol.29, No.1, pp.111-125	6/1-5,7-15
Y	Akihide KAMIYA et al., Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal., The EMBO Journal (1999), Vol.18, No.8, pp.2127-2136	1-5,7-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 January, 2002 (18.01.02)Date of mailing of the international search report
29 January, 2002 (29.01.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10236

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 16
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the "differentiation controlling agent" as set forth in the above claim, the description discloses no specific "differentiation controlling agent" but merely a general screening method. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what specific substances are involved in the scope thereof. Namely, the above claim is described in an extremely unclear manner. Such being the case, no meaningful international search can be practiced on the above claim.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/02, C12Q1/02, A61K38/17, A61K45/00, A61L27/00, A61P1/16, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/02, C12Q1/02, A61K38/17, A61K45/00, A61L27/00, A61P1/16, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN) WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	Toshihiro MITAKA et al., Reconstruction of Hepatic Organoid Small Hepatocytes and Hepatic Nonparenchymal Cells., HEPATOLOGY (1999), Vol. 29, No. 1, p. 111-125	6/1-5, 7-15
Y	Akihide KAMIYA et al., Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal., The EMBO Journal (1999), Vol. 18, No. 8, p. 2127-2136	1-5, 7-15

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.01.02

国際調査報告の発送日

29.01.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明照

4B 2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 16 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
前記請求の範囲の「分化調節剤」について、明細書には、一般的なスクリーニング方法が記載されているのみであり、具体的な「分化調節剤」については何ら記載されていない。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのようなものが包含されるのか全く不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲について、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.